

М.Б. Галкін, В.О. Іваниця, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеській національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65058, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

МАТРИКС БІОПЛІВКИ – ХІМІЧНИЙ СКЛАД, СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ

Біоплівки є спільнотами мікробних клітин, які беруть участь в різних процесах, в тому числі в біоремедіації стічних вод, стимулюванні зростання рослин, хронічних інфекціях і промислових обростаннях. Клітини-резиденти біоплівки занурені в гідратований екзополімерний матрикс, компоненти якого синтезуються самими мікроорганізмами. Матрикс зазвичай містить поліцукриди, білки, нуклеїнові кислоти і ліпіди; він забезпечує механічну стабільність біоплівок, опосередковує їх адгезію до поверхонь і утворює компактну тривимірну полімерну структуру, яка забезпечує контакт між клітинами і їх транзиторне утримання в біоплівці. Матрикс виконує різні функції для спільноти: від забезпечення структурної жорсткості і захисту від зовнішнього середовища до контролю генної регуляції і адсорбції поживних речовин. Глибоке знання властивостей матриксу має виключно важливе значення для розробки нових стратегій контролю біопліткових інфекцій, для промислового і біотехнологічного використання біоплівок. Це стосується структури окремих компонентів, характеру взаємодії між молекулами і тривимірної просторової організації.

Дана робота присвячена огляду сучасних уявлень щодо складу структури та властивостей матриксу біоплівки як мікросередовища для існування клітин мікроорганізмів.

Ключові слова: біоплівка, матрикс, поліцукриди, білки, еДНК, ліпіди, біосурфактанти.

Найважливішим компонентом біоплівки є так званий матрикс (позаклітинна полімерна субстанція). Він є комплексом біополімерів, який синтезується клітинами мікроорганізмів, що формують біоплівку [2, 15, 34]. До складу матриксу входять поліцукриди, структурні білки, екзоферменти, нуклеїнові кислоти, тощо (рис. 1). Якісний і кількісний склад цих компонентів значно варіює в залежності від видів мікроорганізмів, що формують біоплівку, і від умов, в яких ці біоплівки утворюються. Так, у складі матриксу біоплівок, утворених хемолітотрофними мікроорганізмами, міститься значна кількість різних неорганічних сполук, наприклад сірки або кремнію.



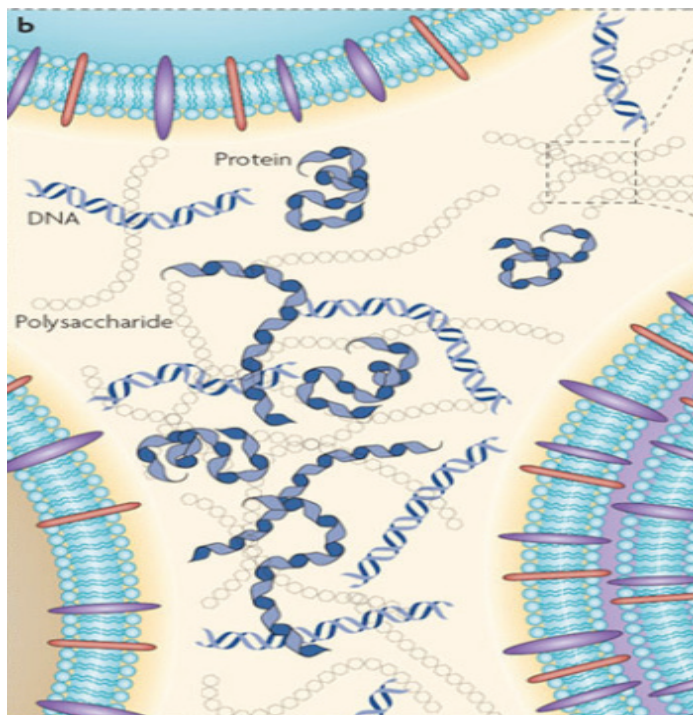


Рис. 1. Основні компоненти матриксу біоплівки [16]

Fig. 1. The major biofilm matrix components [16]

Матрикс відіграє головну роль в організації та функціонуванні біоплівки. Насамперед, він сприяє просторовій організації цих структур, відокремлює мікроорганізми від зовнішнього середовища та захищає від його негативного впливу. Значний ступінь в'язкості матриксу, зумовлений поліцукридами, що входять до його складу, дозволяє, з одного боку, сконцентрувати синтезовані екзоферменти поряд з клітинами, а, з іншого боку, перешкоджає рівномірному розподілу по всій біоплівці несприятливих для неї речовин, таких як, наприклад, антибіотики і дезінфектанти.

Компоненти матриксу біоплівки можуть так само слугувати резервними джерелами основних біогенних елементів у разі дефіциту поживних речовин, що дозволяє мікроорганізмам біоплівки, деякий час існувати за їх рахунок. Серед основних функцій матриксу можна виділити такі [16]:

1. Участь у процесі адгезії – матрикс забезпечує початкові етапи колонізації різних поверхонь клітинами і довготривале прикріплення біоплівок до них.
2. Участь в агрегації клітин – створення зв'язків між клітинами, тимчасова іммобілізація популяції, підвищення щільності клітин в певній точці простору.
3. Коhezія – формування полімерних мереж, що забезпечують механічну стабільність біоплівок, і складної архітектури.

4. Утримання води – утворення поліцукридного гелю, який протидіє втраті вологи в сухих умовах.
5. Створення захисного бар'єру – забезпечення резистентності до неспецифічних і специфічних чинників захисту макроорганізму, толерантність до антимікробних засобів, захист ферментів від несприятливого впливу (наприклад, нітрогенази ціанобактерій від негативного впливу кисню), протидія поїданню деякими найпростішими.
6. Сорбція органічних сполук і неорганічних йонів – зв'язування поживних речовин, ксенобіотиків, йонів важких металів; участь в обміні йонів; формування поліцукридного гелю.
7. Каталітична активність – забезпечення підвищеної активності екзоферментів за рахунок їх іммобілізації в поліцукридній матриці та переробки поживних речовин.
8. Створення запасів джерел живлення – карбон-нітроген- і фосфорвмісних сполук.
9. Сприяння генетичній мінливості – забезпечення горизонтального переносу генетичного матеріалу між клітинами в біоплівках.
10. Підтримання окисно-відновного потенціалу – забезпечення міжклітинного перенесення електронів за участі фімбрій та білкових нанодротів.
11. Експорт клітинних компонентів – забезпечення обміну з навколишнім середовищем за допомогою везикул, що містять білки, нуклеїнові кислоти, ліпополіцукриди і фосфоліпіди.

Поліцукриди матриксу біоплівки

Серед усіх компонентів, що входять до складу матриксу біоплівки, основну роль у його побудові відіграють екзополіцукриди (ЕПС). У кількісному співвідношенні це найбільш поширені в матриксі біополімери. У середньому, в залежності від конкретної біоплівки, їх кількість варіює від 50 до 90% від загальної маси сухої речовини матриксу. Більшість екзополіцукридів біоплівки це досить великі полімери з молекулярною масою від $0,5 \times 10^6$ до 2×10^6 дальтон [16]. На сьогоднішній день поліцукриди знайдені в матриксі біоплівок практично всіх досліджених мікроорганізмів. Застосування різних біохімічних методів, а також методів електронної та флуоресцентної мікроскопії (з використанням мічених флуоресцентними барвниками лектинів і моноклональних антитіл) дозволило детально охарактеризувати ці біополімери [53]. Основна роль поліцукридів у складі матриксу біоплівки – додання жорсткості конструкції за рахунок взаємодії між окремими полімерами. Це зумовлено тим, що між ланцюгами ЕПС здійснюються слабкі фізико-хімічні взаємодії, що стабілізують структуру (рис. 2).

Серед таких взаємодій можна виділити:

1. Формування водневих зв'язків – утворюються між ОН-групами орієнтованими на зовні від основного полімерного скелета.
2. Електростатичні взаємодії – виникають між гідрофільними і гідрофобними групами поліцукридних ланцюгів (наприклад, між ОН- і CH_3 -групами).



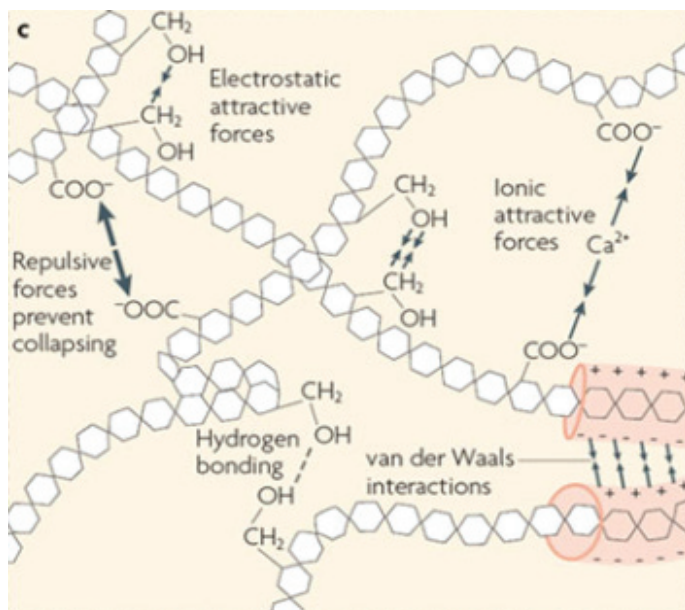


Рис. 2. Види слабких фізико-хімічних взаємодій між ланцюгами ЕПС матриксу [16]

Fig. 2. The varieties of weak physicochemical interactions and the entanglement of biopolymers that dominate the stability of the EPS matrix [16]

3. Йонні взаємодії – зумовлені зв’язуванням негативно заряджених груп поліцукридних ланцюгів за допомогою катіонів двовалентних металів (наприклад, $\text{COO}^- - \text{Ca}^{2+} - \text{OOC}^-$)
4. Сили відштовхування – виникають між однаково зарядженими групами запобігаючи колапсу структури.
5. Ван дер Ваальсові взаємодії – орієнтовані взаємодії в тих ділянках поліцукридних ланцюгів де зовнішні угруповання поліцукридів формують диполі.

За своїм складом поліцукриди матриксу біоплівки можна розділити на два основних типи – гомополіцукриди і гетерополіцукриди. Гомополіцукриди у складі матриксу біоплівки зустрічаються лише у відносно невеликого числа мікроорганізмів. Вони зазвичай представлені глюкоанами і фруктанами, що синтезуються бактеріями роду *Streptococcus* в біоплівках на поверхні зубів [43], та целюлозою, що синтезується *Gluconobacter xylinus*, *Agrobacterium tumifaciens*, *Rhizobium spp.* а також деякими представниками родини *Enterobacteriaceae* [67].

Екзополіцукриди матриксу біоплівок більшості бактерій є сумішшю з нейтральних і заряджених гетерополіцукридів. Вони також містять значну кількість різних органічних і неорганічних замісників, які значною мірою впливають на їх фізичні та біологічні властивості. Так, у зв’язку з наявністю у складі уронових кислот деякі з таких поліцукридів, включаючи альгінат, ксантан і коланову кислоту, є поліаніонними. Так само існують і полікатионні адгезини. Прикладом може слугувати інтерклітинний адгезин *Staphylococcus aureus* і *S. epidermidis*,

що складається із залишків β -1,6-N-ацетилглюкозаміну. У *S. epidermidis* також є екзополіцукрид, що складається з 130 залишків 2-деокси-2-аміно-D-глюкопіранозила. Характерною особливістю цього екзополіцукриду є те, що він існує у двох формах – мажорній (близько 80%) і мінорній. Мінорна форма цього поліцукриду відрізняється тим, що містить меншу кількість не-ацетильованих залишків, а також значну кількість фосфатних залишків [8, 41].

Склад екзополіцукридів матриксу біоплівки може значно відрізнятися не тільки у різних видів мікроорганізмів, але і в межах штамів одного виду. Наприклад, різні штами *S. termophilus* синтезують гетерополіцукриди, які відрізняються один від одного складом мономерів і молекулярною масою [58]. У *P. aeruginosa* у складі матриксу біоплівки виявлено як мінімум три екзополіцукриди, що відрізняються за хімічною будовою та фізико-хімічними властивостями – Pel, Psl і альгінат [44], який є найбільш вивченим екзополіцукридом матриксу біоплівки цієї бактерії. За своїм хімічним складом він відноситься до класу аніонних гетерополіцукридів, який будується з уронових кислот. Альгінат є нерозгалуженим гетерополімером з високою молекулярною масою, складається з 1,4-зв'язаних залишків β -D-мануронату і α -L-гулурунату. Ці мономери укладаються в гомополімерні блоки полімануронату і гетерополімерні послідовності з випадково розташованими залишками α -L-гулурунату і частково з O-ацетильованими залишками манноуронату [16]. Надпродукція цього екзополіцукриду зумовлює приналежність до мукоїдних штамів *P. aeruginosa* і викликана мутацією в гені *mucA*, який негативно регулюється σ -фактором AlgU. Альгінат задіяний у процес утворення мікроколоній на ранніх етапах формування біоплівки *P. aeruginosa*, проте, він грає велику роль і у процесі стабілізації зрілої біоплівки. У немуккоїдних штамів *P. aeruginosa* цю роль виконують Pel і Psl. Pel це поліцукрид з високим вмістом глюкози, тоді як Psl є структурою, що складається з повторюваних послідовностей пентацукридів, які містять D-манозу, D-глюкозу і L-рамнозу [5]. Pel є необхідним для формування так званих пеліклів – біоплівок, що утворюються на межі розділу фаз повітря-рідина, тоді як Psl забезпечує прикріплення до абіотичних і біотичних поверхонь, а також формування відповідної архітектури біоплівки *P. aeruginosa*. Psl зв'язується на поверхні клітин у вигляді спіралей, і, можливо, забезпечує агрегацію клітин між собою [27].

Для багатьох мікроорганізмів екзополіцукриди є ключовими для процесу формування біоплівки. Мутантні штами цих мікроорганізмів, дефектні за синтезом екзополіцукридів, або зовсім не можуть формувати зрілі біоплівки, або цей процес у них значно порушується [7, 27, 60]. Іноді такі мутанти зберігають здатність до адгезії, а також обмежену здатність до формування мікроколоній. Однак, в полівидових біоплівках за наявності в їх складі видів, що синтезують власні екзополіцукриди, такі мутанти отримують можливість інтегруватися до складу співтовариства [52]. Тому, пропорція різних екзополіцукридів в змішаних біоплівках не завжди збігається з біорізноманітністю такої спільноти [49].



Білки матриксу біоплівки

Другим за вмістом компонентом матриксу біоплівки є екзобілки, які поділяються за своїм призначенням на дві великі групи [13, 20]: структурні білки та екзоферменти.

У біоплівках виявляється значна кількість різних екзоферментів, багато з яких залучаються до деградації біополімерів. Субстратом цих ферментів є водорозчинні компоненти (такі як поліцукриди, нуклеїнові кислоти і білки), а так само деякі водонерозчинні полімери (целюлоза, хітин, ліпіди) і різні органічні частки захоплені біоплівкою [62]. Основні ферменти матриксу біоплівки наведені в таблиці.

Таблиця

Головні ферменти матриксу біоплівки [63]

Table

Major enzymes in biofilm matrix [63]

Ферменти	Функція
Протеази Пептидази	Гідроліз білків
Ендоцеллюлази Хітинази α -Глюкозооксидази β -Глюкозооксидази β -Ксилозидази N-Ацетил- β -глюкозамінідази Хітобіозидази β -Глюкуронідази	Гідроліз полі- або олігоцукридів
Фосфатази	Фосфомоноестеразна активність
Фенооксидази Пероксидази	Оксидоредуктазна активність

Наявність в матриксі біоплівки ферментів забезпечує його деградацію, сприяє розпаду біополімерів на низькомолекулярні продукти, які згодом можуть бути використані мікроорганізмами як джерела вуглецю і енергії. Ці ж ферменти беруть участь і в завершенні життєвого циклу біоплівки, провокуючи відкріплення клітин. Деякі інші ферменти, такі як еластаза і гіалуронідаза є важливими факторами патогенності, що забезпечують розвиток інфекційного процесу [1].

Деякі ферменти матриксу біоплівки бактерій і грибів становлять значний комерційний інтерес. Завдяки широкому спектру різних ферментів у складі матриксу, біоплівки можуть бути використані для біоочищення, наприклад, стічних вод, від органічних забруднювачів.



Ферменти матриксу також зумовлюють деградацію синтетичних полімерів мікроорганізмами. Більш того, ферменти матриксу біоплівки, які беруть участь у підтримці окисно-відновного потенціалу, зумовлюють біокорозію.

Ферменти добре інтегруються в матрикс біоплівки, у зв'язку зі своєю здатністю іммобілізуватися на екзополіцукридах [62, 63]. Наприклад, у *P. aeruginosa* екзоліпаза LipA іммобілізується на альгінаті за рахунок слабкої взаємодії [29]. Іммобілізація ферментів на поліцукридних ланцюгах сприяє підвищенню їх активності, а також, забезпечує протікання реакцій, що каталізуються цими ферментами, на оптимальній відстані від клітин, що призводить до оптимізації процесу поглинання клітинами кінцевих продуктів цих реакцій. Більш того, взаємодія ферментів і ЕПС підвищує їх термостабільність і резистентність до протеолізу [51].

Багато екзоферментів мікроорганізмів активно беруть участь у деградації компонентів матриксу біоплівки у випадку нестачі поживних речовин [13, 66]. Прикладом компонентів матриксу, що зазнають ферментативного руйнування у разі голодування можуть слугувати декстран, інулін і леван, що синтезуються бактеріями роду *Streptococcus* у ротовій порожнині, а також леван, який присутній в так званих “матричних порожнинах” (порах і каналах всередині матриксу біоплівки, що містять ліпіди і воду, але не містять гідратовані молекули поліцукридів) біоплівки *Pseudomonas syringae* [25, 37]. Екзополіцукриди зазвичай руйнуються шляхом гідролізу або лізису, однак, швидкість такої деградації є досить низькою [56]. У морських строматолітах екзополіцукриди і білки матриксу секретуються бактеріями, і, потім швидко фрагментуються і перебудовуються, зазвичай сульфат-редукувальними бактеріями в більш стійкі полімери [10].

Другою групою білків матриксу біоплівки є структурні білки, такі як білки, асоційовані з клітинною поверхнею, і глікопептиди. Структурні білки грають важливу роль у стабілізації та підтримці структури біоплівки, забезпечуючи формування поліцукридних мереж, а також забезпечуючи їх зв'язок з поверхнею клітин мікроорганізмів [16]. Прикладами таких білків можуть слугувати глюканвмісний білок *S. mutans*, лектини зовнішньої мембрани *Azospirillum braziliensis*, а також галактозо-специфічний LecA та фукозо-специфічний LecB *P. aeruginosa*, які залучені в процес формування біоплівки цим мікроорганізмом [11, 17, 26, 31, 55]. Синтетичні високоафінні мультивалентні ліганди, які зв'язуються з LecB, не тільки інгібують процес формування біоплівки *P. aeruginosa*, але і індують розпад вже сформованих біоплівок цього мікроорганізму незалежно від їх віку та стадії розвитку. Це відбувається через те, що комплекс ліганд-LecB втрачає здатність здійснювати стабілізуювальну функцію [21]. Було показано, що секреторний білок CdrA здатний безпосередньо приєднуватися до Psl у біоплівці *P. aeruginosa* [4]. Припускається, що цей білок може існувати у двох формах – екстраклітинній, і мембранозв'язаній. Екстраклітинна форма CdrA сприяє зв'язуванню ланцюгів Psl між собою, тим самим, підсилюючи жорсткість структури матриксу, а мембранозв'язана форма забезпечує взаємодію між матриксом і клітинами.



Іншою важливою групою структурних білків матриксу біоплівки є поверхневі білки, асоційовані з біоплівкою (Var) *S. aureus* і Вар-подібні білки. Це високомолекулярні білки, що знаходяться на поверхні клітин і зумовлюють формування біоплівки деякими видами бактерій [24]. Вони містять коровий домен, що складається з тандемних амінокислотних повторів, які необхідні для формування біоплівки, а також для прояву патогенних властивостей. Важливими білковими компонентами матриксу біоплівки є амілоїди. Амілоїди містять впорядковані білкові повтори довільної довжини, що формують фібрили, які містять бічні ланцюги з β -складчастою вторинною структурою. Ці ланцюги розташовані перпендикулярно до основної осі амілоїдів. Амілоїди залучаються до адгезії до поверхонь неживих клітин і живих організмів, перебігу процесу інвазії, а також виконують функцію цитотоксинів [36].

Нарешті, важливу роль у процесі формування біоплівки виконують складні білкові структури, які знаходяться на поверхні клітин мікроорганізмів, такі як джгутики, фімбрії і пілі. Не входячи формально до компонентів матриксу, ці структури забезпечують взаємодію клітин з компонентами останнього. Так, фімбрії IV типу *P. aeruginosa* здатні зв'язувати позаклітинну ДНК і, можливо, грають роль зв'язувальної структури між клітинами і компонентами матриксу [46]. У *Salmonella typhimurium* і *Escherichia coli* біосинтез тонких агрегативних фімбрій і целюлози, призводить до швидкого формування ригідного гідрофобного матриксу. Порушення ж синтезу таких фімбрій призводить до утворення більш тендітного матриксу, навіть якщо синтез целюлози не порушується [40].

Нуклеїнові кислоти в матриксі біоплівки

Біоплівки багатьох мікроорганізмів містять у складі матриксу екстрацелюлярну ДНК (еДНК) [13]. Кількість еДНК в матриксі біоплівки може сильно відрізнятись навіть у філогенетично споріднених видів. Так, у *S. aureus* кількість еДНК в матриксі біоплівки може досягати 25–30% від сухої маси речовин матриксу, тоді як у близько спорідненого *S. epidermidis* еДНК є мінорним компонентом матриксу біоплівки [19].

Раніше еДНК вважалася лише резидентним компонентом матриксу біоплівки що вивільняється лише у зв'язку з лізисом клітин, проте дослідження останніх років показали, що еДНК є важливим інтегральним компонентом матриксу біоплівки [30, 63]. Важливість нуклеїнових кислот для процесу агрегації клітин була показана для бактерій роду *Rhodovulum*, здатних до самоосадження [59]. Обробка клітин цих бактерій нуклеазами призводить до припинення процесу самоосадження, тоді як використання цукролітичних і пептолітичних ферментів не викликає подібного ефекту [59]. еДНК також є мажорним компонентом матриксу біоплівки *P. aeruginosa*, у якої вона виконує функцію міжклітинного конектора [65]. Показано, що обробка ДНКазми призводить до повного інгібування процесу формування біоплівки цим мікроорганізмом [61].

Джерела еДНК в матриксі біоплівки мабуть не є ідентичними у всіх мікроорганізмів. У гамма-протеобактерії штаму F8 було показано наявність подібності, так і суттєві відмінності в будові еДНК у порівнянні з геномною ДНК,



що є доказом того, що наявність еДНК в матриксі біоплівки цієї бактерії не можна пояснити простим лізисом клітин [2]. Однак, у *P. aeruginosa* і *P. putida* еДНК ідентична геномній [50]. У *S. epidermidis* джерелом еДНК є особлива субпопуляція клітин, які піддаються лізису за участі біфункціонального автолізину (AtlE). Ця ДНК індукує утворення біоплівки іншою частиною популяції [30]. Не дивлячись на все вище описане, функції та природа еДНК в матриксі біоплівки сьогодні ще повністю не з'ясовані.

Ліпіди і сурфактанти матриксу біоплівки

Такі компоненти матриксу як екзополіцукриди, білки і еДНК є гідрофільними компонентами з високим ступенем гідратації, однак у складі матриксу біоплівки зустрічаються і гідрофобні компоненти. Наприклад, ті штами бактерій роду *Rhodococcus*, які не мають фімбрій, адгезуються до поверхні за рахунок наявності сильно гідрофобної капсули, хімічний склад якої відповідає хімічному складу матриксу, що потім утворюється [32]. Капсула і матрикс цих бактерій побудовані з амфіфільних поліцукридів, що містять такі бічні замісники як метильні та ацетильні групи [33].

У матриксі біоплівок також присутні ліпіди, як в асоціації з екзополіцукридами, так і у вільній формі [6]. Так, для *Thiobacillus ferrooxidans* провідну роль у процесі адгезії і формуванні біоплівки грає ліпополіцукрид [45]. *Serratia marcescens* активно синтезує групу ліпідів, які володіють поверхнево-активними властивостями і відомі як серраветтини [28]. Іншими важливими ліпідними продуктами, що входять до складу матриксу біоплівок деяких бактерій є сурфактин, віскозин та емульсан. Вони також мають поверхнево-активні властивості і використовуються для руйнування гідрофобних сполук, підвищуючи тим самим їх біодоступність.

Іншою групою алкаліфільних компонентів матриксу біоплівки є біосурфактанти. Ці речовини володіють антимікробною і антифунгальною активністю, а також регулюють чисельність клітин у складі біоплівки шляхом їх руйнування або провокування відкріплення.

Одними з найбільш вивчених біосурфактантів є рамноліпіди *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* синтезує два основних види рамноліпідів, що відрізняються за кількістю залишків рамнози, яка входить до їх складу – монорамноліпід і дирамноліпід [9]. Рамноліпіди виконують ряд найважливіших біологічних функцій, необхідних для підтримання функціонування біоплівок, сформованих *P. aeruginosa*. Вони забезпечують агрегацію клітин, формування грибоподібних тіл зрілих біоплівок, регулюють газообмін у біоплівці шляхом протидії колонізації матричних порожнин, регулюють чисельність популяції клітин, а також виконують функцію гемолізинів [3, 37].

Вода як компонент матриксу біоплівки

Вода, в кількісному відношенні, є найбільшим компонентом матриксу біоплівки. Матрикс створює дуже гідратоване середовище, яке висихає повільніше, ніж оточення, тим самим, оберігаючи біоплівки від змін водного балансу. Багато



компонентів матриксу біоплівки є дуже гігроскопічними, і збереження води всередині матриксу носить скоріше механічний характер, а не здійснюється за рахунок залучення будь-яких специфічних механізмів її утримання. Передбачається, що в матриксі біоплівки існують так звані «гідралічні розв'язки» (зони, які не обмінюються водою з навколишнім середовищем, наприклад, сухі шари матриксу, які покривають зони з великим вмістом води, проте володіють слабкою здатністю до її транспорту), які утворюються в умовах швидкої гідратації або зневоднення, запобігаючи порушенню водного балансу в біоплівці [35]. Включені в матрикс клітини ціанобактерії *Nostoc commune* підтримують свою фотосинтетичну активність у процесі висушування та регідратації, тоді як за відсутності матриксу, за тих самих умов відбувається порушення процесу фотосинтезу [54].

Формування матриксу біоплівки є відповіддю мікроорганізмів на висушування [39]. Висушування, очевидно, є одним з тих чинників навколишнього середовища, коли формування біоплівки, і, зокрема матриксу, надає найбільшу взаємну вигоду як здатним до синтезу компонентів матриксу, так і не здатним до цього членам спільноти [38]. Висушування призводить до концентрування матриксу, що зумовлює появу великої кількості неспецифічних сайтів зв'язування, здатних реагувати між собою, зменшуючи розміри біоплівки. Подібне можна спостерігати у біоплівках фототрофних мікроорганізмів, які залежно від зсуву водного балансу в навколишньому середовищі в той чи інший бік здатні значно зменшувати або збільшувати свої розміри.

Матрикс біоплівки може грати роль молекулярного сита, регулюючи надходження катіонів, аніонів, неполярних сполук, а також різних частинок з водної фази [14]. У матриксі біоплівки є неполярні регіони, групи з потенційною здатністю до утворення водневих зв'язків, полярні групи (катіонні і аніонні) [57]. У зв'язку з цим, частки і наночастки можуть вловлюватися і накопичуватися в матриксі біоплівки. Важкі метали, такі як Ni^{2+} , Zn^{2+} і Cd^{2+} зв'язуються з клітинною стінкою бактерій, тоді як гідрофобні сполуки, такі як фенол, ксилол і толуол накопичуються безпосередньо в матриксі біоплівки [64]. Наявність у навколишньому середовищі деяких сполук, може призводити до перебудов у структурі та організації матриксу. Так, було виявлено, що у відповідь на присутність толуолу у навколишньому середовищі в матриксі біоплівки *P. putida* значно зростає кількість карбоксильних груп [47].

Матрикс і механічні властивості біоплівки

Механічна стійкість є важливим параметром, що забезпечує тривале існування біоплівок в природних умовах, які постійно змінюються. Як було описано вище, основну роль в процесі механічної стабілізації біоплівки відіграють екзополіцукриди. Для запобігання обростанню будь-яких поверхонь не бажаними біоплівками доводиться враховувати адгезивні і когезивні властивості матриксу. У разі обростання, наприклад катетерів, ступінь стабільності матриксу відіграє визначальну роль у процесі відкріплення і формування клітинно-матричної



емболії, а, відповідно, і в імовірності зараження [51]. У природних умовах, матрикс біоплівки відіграє провідну роль у стабілізації осаджених клітин [14].

Важливу роль у процесі стабілізації біоплівки можуть також грати сили зсуву, що дозволяє припустити наявність фенотипової адаптації в біоплівках [51]. Виявлено, що мікроколонії бактерій під дією постійних сил зсуву здатні переміщуватися по поверхні [42].

Завдяки матриксу біоплівки проявляють в'язко-еластично-пружні властивості. Для них є характерним як наявність зворотної еластичної відповіді, так і незворотної деформації, в залежності від природи і вираженості сил, які діють на матрикс біоплівки. Експерименти з біоплівками *P. aeruginosa* показали, що у відповідь на тиск вони проходять через фазу еластичної реакції до певної критичної точки, за якою біоплівка втрачає в'язко-еластично-пружні властивості [23]. Це, можна пояснити тим, що компоненти матриксу зв'язуються між собою за рахунок описаних вище слабких фізико-хімічних взаємодій. Біоплівки *S. aureus* виявляють еластично-пружну відповідь на короткі за часом стимули і в'язко-рідинну – на тривалі [42]. Зворотна деформація матриксу дозволяє біоплівкам переживати помірні за силою короточасні зовнішні впливи. Це супроводжується певною реорганізацією біоплівки і підвищенням міцності матриксу за рахунок гіперпродукції екзополіцукридів [48]. Важливу роль в процесі зміцнення матриксу біоплівки визначає взаємодія його компонентів з мультивалентними йонами. Наприклад, йони кальцію здатні вступати у взаємодію з альгінатом *P. aeruginosa* зшиваючи між собою його поліаніонні ланцюги [22].

Вивчення реологічних властивостей біоплівок із залученням новітніх методів показало, що у відповідь на будь-які зовнішні стресові впливи в біоплівках значно посилюється когезія (так зване штамове зміцнення) [18]. Магнітуда модуля еластичності (тобто тенденції об'єкта або матеріалу зворотно формувати еластичні сили для відповіді на деформацію), і в'язкості значно варіює серед полівидових біоплівок, що дозволяє використовувати цей параметр як показник еласто-в'язкої відповіді на зовнішні впливи [21, 51]. Час стрес-релаксації (тобто відхилення від ідеальної еластичної поведінки об'єкта або матеріалу у зв'язку з внутрішнім звільненням від стресу під час константної деформації), зазвичай, близько 18 хвилин, часто збігається у багатьох природних біоплівок [48]. Останнє твердження дає підставу припустити, що зазначений час є найкоротшим періодом, за який біоплівка формує фенотипову відповідь на тимчасовий механічний стрес. Проте, у деяких біоплівок час релаксації може бути значно коротшим. Так, у біоплівки *S. epidermidis* час стрес-релаксації становить лише 13,8 секунд [18]. Причини такого явища на сьогодні залишаються не ясними.

Виходячи з вище описаного, можна зробити висновок, що матрикс біоплівки завдяки своєму складу та будові формує оптимальне мікросередовище для існування клітин мікроорганізмів. Його функції численні: він забезпечує механічну стійкість біоплівок і захищає мікроорганізми від висихання; матрикс виконує роль бар'єру від несприятливих хімічних і біологічних впливів, таких як осмотичний шок, зміна рН і концентрація кисню, антибіотик і антисептик, імунна система макроорганізму, поїдання найпростішими. Крім того, він сприяє



сорбції та зберіганню поживних речовин і мікроелементів, є місцем протікання позаклітинних ензиматичних реакцій. Матрикс забезпечує тісний контакт бактеріальних клітин один з одним, що полегшує обмін генетичним матеріалом між ними. Часто біоплівку образно називають “містом” мікроорганізмів. Тоді матрикс можна розглядати як їх інфраструктуру. Поглиблення знань щодо цієї інфраструктури дасть можливість покращити контроль за інфекційним процесом, а також широко використовувати біоплівкові технології у промисловості.

Н.Б. Галкин, В.А. Иваныця, Б.М. Галкин, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: (0482) 68 79 64
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

МАТРИКС БИОПЛЁНКИ – ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СТРУКТУРА, СВОЙСТВА

Реферат

Биопленки являются сообществами микробных клеток, которые принимают участие в различных процессах, в том числе в биоремедиации сточных вод, стимулировании роста растений, хронических инфекциях и промышленных обрастаниях. Клетки-резиденты биопленки заключены в гидратированный экзополимерный матрикс, компоненты которого синтезируются самими микроорганизмами. Матрикс обычно содержит полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и липиды; он обеспечивает механическую стабильность биопленок, опосредует их адгезию к поверхностям и образует компактную трехмерную полимерную структуру, которая обеспечивает контакт между клетками и их транзитное удержание в биопленке. Матрикс выполняет различные функции для сообщества: от обеспечения структурной жесткости и защиты от внешней среды до контроля генной регуляции и адсорбции питательных веществ. Глубокое знание свойств матрикса имеет исключительно важное значение для разработки новых стратегий контроля биопленочных инфекций, для промышленного и биотехнологического использования биопленок. Это касается структуры отдельных компонентов, характера взаимодействия между молекулами и трехмерной пространственной организации.

Даная работа посвящена обзору современных представлений о составе, структуре и свойствах матрикса биоплёнки, как микросреды для существования клеток микроорганизмов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: биоплёнка, матрикс, полисахариды, белки, эДНК, липиды, биосурфактанты.



M.B. Galkin, V.O. Ivanytsia, B.M. Galkin, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: (0482) 68 79 64
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

**BIOFILM MATRIX – CHEMICAL COMPOSITION,
STRUCTURE, FUNCTIONS**

Summary

Biofilms are the communities of microbial cells that underpin diverse processes including sewage bioremediation, plant growth promotion, chronic infections and industrial biofouling. The cells resident in the biofilm are encased within a self-produced hydrated exopolymeric matrix. The matrix commonly comprises polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids; they provide the mechanical stability of biofilms, mediate their adhesion to surfaces and form a cohesive, three-dimensional polymer network that interconnects and transiently immobilizes biofilm cells. This matrix fulfils a variety of functions for the community, from providing structural rigidity and protection from the external environment to controlling gene regulation and nutrient adsorption. Profound knowledge of the biofilm matrix properties is extremely important for the development of novel strategies to control biofilm infections, for the industrial and biotechnological biofilm using. It concerns the structure of the individual components, the nature of the interactions between the molecules and the three-dimensional spatial organization. This work is the overview of the modern looks about the chemical composition, structure and functions of the biofilm matrix as microenvironment for the biofilm cells life.

Key words: biofilm, matrix, polysaccharides, proteins, eDNA, lipids, biosurfactants.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adair C. G., Gorman S. P., Feron B. M. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia // *Intens. Care Med.* – 1999. – V. 25. – P. 1072–1076.
2. Böckelmann U., Janke A., Kuhn R., Neu T.R., Wecke J., Lawrence J.R., Szewzyk U. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – V. 262. – P. 31–38.
3. Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilms communities // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 16630–16635.
4. Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V. 59. – P. 1229–1238.
5. Byrd M. S. Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V. 73. – P. 622–638.
6. Conrad A. Suutari M. K., Keinänen M. M., Cadoret A., Faure P., Mansuy-Huault L., Block J. C. Fatty acid lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs // *Lipids.* – 2003. – V. 38. – P. 1093–1105.



7. Danese P. N., Pratt L. A., Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182. – P. 3593–3596.
8. Davey M. E., O’Toole G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microb. mol. boil. rev. – 2000. – V. 64. – № 4. – P. 847–867.
9. Davey M. E. Cajazza N. C., O’Toole, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185. – P. 1027–1036.
10. Decho A. W., Visscher P. T., Reid R. P. Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite // Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol. – 2005. – V. 219. – P. 71–86.
11. Diggle S. P., Stacey R. E., Dodd C., Cámara M., Williams P., Winzer K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ. Microbiol. – 2006. – V. 8. – P. 1095–1104.
12. Flemming H. C., Neu T. R., Wozniak D. The EPS matrix: the house of biofilm cells // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189 – P. 7945–7947.
13. Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen, P. H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin // Water Res. – 1996. – V. 30. – P. 1749–1758.
14. Gerbersdorf S. U., Jancke T., Westrich B., Paterson, D. M. Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances // Geobiology. – 2008. – V. 6. – P. 57–69.
15. Hall-Stoodley, Nistico L., Luanne K.S., et al. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates // BMC Microbiology. – 2008. – V 8. – P. 1–16.
16. Hans-Curt Flemming, Jost Wingender. The biofilm matrix // Nat. rev. microbial. – 2010. – V. 8. – P. 623–633.
17. Higgins M. J., Novak J. T. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation // J. Environ. Eng. – 1997. – V. 123. – P. 479–485.
18. Hohne D. N., Younger G. J., Solomon M. J. Flexible multifluidic device for mechanical property characterization of soft viscoelastic solids such as bacterial biofilms // Langmuir. – 2009. – V. 25. – P. 7743–7751.
19. 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 // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. – P. 470–476.
20. Jahn A., Nielsen P. H. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms // Water Sci. Technol. – 1998. – V. 37 – P. 17–24.
21. Johansson E. M., Cruz E., Kolomiets L., Buts, R. U., Kadam, K. M., Bartels S. P. Diggle, et al. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB // Chem. Biol. – 2008. – V. 15. – P. 1249–1257.



22. Klausen M. M., Thomsen T. R., Nielsen J. L., Mikkelsen L. H. Nielsen P. H. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs // FEMS Microbiol. Ecol. – 2004. – V. 50. – P. 123–132.
23. Körstgens V., Flemming H. C., Wingender J., Borchard W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* // Water Sci. Technol. – 2001. – V. 43. – P. 49–57.
24. Lasa I., Penadés J. R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation // Res. Microbiol. – 2006. – V. 157. – P. 99–107.
25. Laue H., Schenk A., Li H., Lambertsen L., Neu T. R., Molin S., Ullrich M. S. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae* // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 2909–2918.
26. Lynch D. J., Fountain T. L., Mazurkiewicz, Banas J. A. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – V. 268. – P. 158–165.
27. Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5. – P. 1–11
28. Matsuyama T., Nakagawa Y. Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions // J. Microbiol. Methods. – 1996. – V. 25. – P. 165–175.
29. Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H. C. The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. – V. 26. – P. 3–16.
30. Molin S., Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure // Curr. Opin. Biotechnol. – 2003. – V. 14. – P. 255–261.
31. Mora P., Rosconi F., Franco Fraguas L., Castro-Sowinski S. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium // Arch. Microbiol. – 2008. – V. 189. – P. 519–524.
32. Neu T. R., Poralla K. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain // FEMS Microbiol. Lett. – 1988. – V. 49. – P. 389–392.
33. Neu T. R., Dengler T., Jann B., Poralla K. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain // J. Gen. Microbiol. – 1992. – V. 138. – P. 2531–2537.
34. O'Toole G. A. To Build a Biofilm // Journal of Bacteriology. – 2003. – V. 185. – № 9. – P. 2687–2689.
35. Or D., Phutane S., Dechesne A. Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils // Vadose Zone J. – 2007. – V. 6. – P. 298–305.
36. Otzen D., Nielsen P. H. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid // Cell. Mol. Life Sci. – 2007. – V. 65. – P. 910–927.
37. Pamp S. J., Gjermansen, M., Tolker-Nielsen T. In The Biofilm Mode of Life. Mechanisms and Adaptations / eds Kjelleberg, S., Givskov M. – Horizon Bioscience, Norfolk, UK. – 2007. – P. 37–69



38. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes // *Microbiol. Rev.* – 1994. – V. 58. – P. 755–805.
39. Roberson E. B., Firestone M. K. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V. 58. – P. 1284–1291.
40. Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – P. 1452–1463.
41. Rupp M. E., Ulphani J. S., Fey P. D., Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutination of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 67. – P. 2627–2632.
42. Rupp C. J., Fux C. A., Stoodley P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 2175–2178.
43. Russell R. R. B. Bacterial Polysaccharides in Dental Plaque. In *Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends* / Ed. Ullrich, M. Caister Academic, Norfolk, UK. – 2009. – P. 143–156.
44. Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – V. 10 – P. 644–648.
45. Sand W., Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria // *Res. Microbiol.* – 2006. – V. 157. – P. 49–56.
46. van Schaik E. J., Giltner C. L., Audette G. F., Keizer D. W., Bautista D. L., Shupsky C. M., Sykes B. D., Irvin R. T. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187. – P. 1455–1464.
47. Schmitt J., Nivens D., White D. C., Flemming, H. C. Changes of biofilm properties in response to sorbed substances — an FTIR-ATR-study // *Water Sci. Technol.* – 1995. – V. 32. – P. 149–155.
48. Shaw T., Winston M., Rupp C. J., Klapper I., Stoodley P. Commonality of elastic relaxation times in biofilms // *Phys. Rev. Lett.* – 2004. – V. 93. – P. 98–102.
49. Skillman L., Sutherland I. W., Jonse, M. V. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – V. 85. – P. 13–18.
50. Steinberger R. E., Holden P. A. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 5404–5410.
51. Stoodley P., Cargo R., Rupp C. J., Wilson S., Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – V. 29. – P. 361–367.
52. Sutherland I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment // *Trends Microbiol.* – 2001. – V. 9. – P. 222–227.
53. Sutherland I. W. in *Comprehensive Glycoscience* / ed. Kamerling, J. P. – Elsevier, Doordrecht. – 2007. – V. 2. – P. 521–558.



54. Tamaru Y., Takami Y., Yoshida T., Sakamoto T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 7327–7333.
55. Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation // Microbiology. – 2005. – V. 151. – P. 1313–1323.
56. Ude S., Arnold D. L., Moon C. D., Timms-Wilson T., Spiers A. J. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates / Ude S., Arnold D. L., Moon C. D., Timms-Wilson T., Spiers A. J. // Environ. Microbiol. – 2006. – V. 8. – P. 1997–2011.
57. VanHullebusch E. D., Zandvoord M. H., Lens P. N. L. Metal immobilization by biofilms: mechanisms and analytical tools // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2004. – V. 2. – P. 9–33.
58. Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 900–912.
59. Watanabe M. Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 50. – P. 682–691.
60. Watnik P. I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. // Mol. Microbiol. – 1999. – V. 34. – P. 586–595.
61. Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. S., Mattick J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation // Science. – 2002. – V. 295. – P. 1487.
62. Wingender J., Jaeger K. E., Flemming H. C. In Microbial Extracellular Polymeric Substances. / eds Wingender J., Neu T., Flemming, H. C. – Springer, Heidelberg. – 1999. – P. 231–251.
63. Wingender J., Jaeger K. E. In Encyclopedia of Environmental Microbiology. / ed. Bitton G. – Wiley, New York. – 2002. – P. 1207–1223.
64. Wuertz S. A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals // Water Sci. Technol. – 2001. – V. 43. – P. 25–34.
65. Yang L., Barken K. B., Skindersoe M. E., Christensen A. B., Givskov M., Tolker-Nielsen T. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology. – 2007. – V. 153. – P. 1318–1328.
66. Zhang X., Bishop P. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances // Chemosphere. – 2003. – V. 50. – P. 63–69.
67. Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix // Mol. Microbiol. – 2001. – V. 39. – P. 1452–1463.



REFERENCES

1. Adair CG, Gorman SP, Feron BM. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intens. Care Med.* 1999;25:1072–1076.
2. Böckelmann U, Janke A, Kuhn R, Neu TR, Wecke J, Lawrence JR, Szewzyk U. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;262:31–38.
3. Boles BR, Thoendel ., Singh P. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilms communities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101:16630–16635.
4. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:1229–1238.
5. Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* 2009;73: 622–638.
6. Conrad A, Suutari MK, Keinänen MM, Cadoret A, Faure P, Mansuy-Huault L, Block JC Fatty acid lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids.* 2003;38:1093–1105.
7. Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 2000;182:3593–3596.
8. Davey ME, O’Toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microb. mol. boil. rev.* 2000;64:847–867.
9. Davey ME, Cajazza NC, O’Toole, GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 2003;185:1027–1036.
10. Decho AW, Visscher PT, Reid RP. Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleocol.* 2005;219:71–86.
11. Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Cámara M, Williams P, Winzer K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 2006;8:1095–1104.
12. Flemming HC, Neu TR, Wozniak D. The EPS matrix: the house of biofilm cells. *J. Bacteriol.* 2007;189:7945–7947.
13. Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen, PH. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 1996;30:1749–1758.
14. Gerbersdorf SU, Jancke T, Westrich B, Paterson DM. Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances. *Geobiology.* 2008;6:57–69.
15. Hall-Stoodley, Nistico L, Luanne KS. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiology.* 2008;8:1–16.



16. Flemming HG, Jost Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. rev. microbial.* 2010;8:623–633.
17. Higgins MJ, Novak JT. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Environ. Eng.* 1997;123:479–485.
18. Hohne DN, Younger GJ, Solomon MJ. Flexible multifluidic device for mechanical property characterization of soft viscoelastic solids such as bacterial biofilms. *Langmuir.* 2009;25:7743–7751.
19. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74:470–476.
20. Jahn A, Nielsen PH. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci. Technol.* 1998;37:17–24.
21. Johansson EM, Crusz E, Kolomiets L, Buts RU, Kadam KM, Bartels SP, Diggle SP. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB. *Chem. Biol.* 2008;15:1249–1257.
22. Klausen MM, Thomsen TR, Nielsen JL, Mikkelsen LH, Nielsen PH. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004;50:123–132.
23. Körstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci. Technol.* 2001;43:49–57.
24. Lasa I, Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* 2006;157:99–107.
25. Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen L, Neu TR, Molin S, Ullrich MS. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology.* 2006;152:2909–2918.
26. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007;268:158–165.
27. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 2009;5:1–11
28. Matsuyama T, Nakagawa Y. Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J. Microbiol. Methods.* 1996;25:165–175.
29. Mayer C, Moritz R, Kirschner C, Borchard W, Maibaum R, Wingender J, Flemming HC. The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999;26:3–16.
30. Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003;14:255–261.



31. Mora P, Rosconi F, Fraguas FL, Castro-Sowinski S. *Azospirillum brasiliense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium. Arch. Microbiol. 2008;189:519–524.
32. Neu TR, Poralla K. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain. FEMS Microbiol. Lett. 1988;49:389–392.
33. Neu TR, Dengler T, Jann B, Poralla K. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. J. Gen. Microbiol. 1992;138:2531–2537.
34. O'Toole GA. To Build a Biofilm. J. of Bacteriol. 2003;185:2687–2689.
35. Or D, Phutane S, Dechesne A. Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils. Vadose Zone J. 2007;6:298–305.
36. Otzen D, Nielsen PH. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. Cell. Mol. Life Sci. 2007;65:910–927.
37. Pamp SJ, Gjermansen, M, Tolker-Nielsen T. In The Biofilm Mode of Life. Mechanisms and Adaptations / eds Kjelleberg, S., Givskov M. – Horizon Bioscience, Norfolk, UK. 2007:37–69
38. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol. Rev. 1994;58:755–805.
39. Roberson EB, Firestone MK. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. 1992;58:1284–1291.
40. Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Mol. Microbiol. 2001;39:1452–1463.
41. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutination of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. Infect. Immun. 1999;67:2627–2632.
42. Rupp CJ, Fux CA, Stoodley P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. Appl. Environ. Microbiol. 2005;71:2175–2178.
43. Russell RRB Bacterial Polysaccharides in Dental Plaque. In Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends / Ed. Ullrich, M. Caister Academic, Norfolk, UK. – 2009;143–156.
44. Ryder C, Byrd M, Wozniak D.J. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr. Opin. Microbiol. 2007;10:644–648.
45. Sand W, Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. Res. Microbiol. 2006;157:49–56.

46. van Schaik EJ, Giltner CL, Audette GF, Keizer DW, Bautista DL, Slupsky CM, Sykes BD, Irvin RT. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J. Bacteriol.* 2005;187:P. 1455–1464.
47. Schmitt J, Nivens D, White DC, Flemming, HC. Changes of biofilm properties in response to sorbed substances — an FTIR-ATR-study. *Water Sci. Technol.* 1995;32:149–155.
48. Shaw T, Winston M, Rupp CJ, Klapper I, Stoodley P. Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Phys. Rev. Lett.* 2004;93:98–102.
49. Skillman L, Sutherland IW, Jonse MV. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J. Appl. Microbiol.* 1999;85:13–18.
50. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:5404–5410.
51. Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003;29:361–367.
52. Sutherland IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 2001;9:222–227.
53. Sutherland IW. In *Comprehensive Glycoscience* / ed. Kamerling, J. P. – Elsevier, Doordrecht. 2007;2:521–558.
54. Tamaru Y, Takami Y, Yoshida T, Sakamoto T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:7327–7333.
55. Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S., Rosenau F, Jaeger K. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology.* – 2005;151:1313–1323.
56. Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* 2006;8:1997–2011.
57. VanHullebusch ED, Zandvoord MH, Lens PNL. Metal immobilization by biofilms: mechanisms and analytical tools. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2004;2: P. 9–33.
58. Vaningelgem F, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Vancanneyt M, Swings J, De Vuyst L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70:900–912.
59. Watanabe M. Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998;50:P. 682–691.
60. Watnik PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999;34:586–595.
61. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PS, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002;295:1487.



62. Wingender J, Jaeger KE, Flemming HC. In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. / eds Wingender J., Neu T., Flemming, H. C. – Springer, Heidelberg. 1999:Р. 231–251.

63. Wingender J, Jaeger KE. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. / ed. Bitton G. – Wiley, New York. 2002:1207–1223.

64. Wuertz S. A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Sci. Technol.* 2001;43:25–34.

65. Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2007;153:1318–1328.

66. Zhang X, Bishop P. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*. 2003;50:63–69.

67. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 2001;39:1452–1463.

Стаття надійшла до редакції 26.09.2016 р.

