

## Проблемы в медицине, связанные с бактериальными плёнками

А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

Данная статья представляет собой обзор современных представлений о микробных сообществах и биоплёнках как явлении, имеющем важное клиническое значение. В обзоре подробно рассмотрено строение бактериальной биоплёнки, этапы и механизмы её образования и участвующие в этом процессе гены и факторы. Приведены имеющиеся данные о сигнальных молекулах (аутоиндукторах), обеспечивающих феномен, который получил название «quorum sensing» (чувство кворума). В статье рассмотрены известные и предполагаемые механизмы выживания бактерий в биоплёнках, их защиты

от внешних факторов и повышенной резистентности к антимикробным препаратам. Особое внимание уделено описанию потенциальных мишеней, воздействие на которые может приводить к нарушению образования биопленки или её разрушению. Приведены исследования по изучению эффектов макролидов и их комбинаций с другими антибиотиками на микробные биоплёнки.

**Ключевые слова:** биоплёнка, адгезия, quorum sensing, аутоиндукторы, резистентность, антибиотики, макролиды.

### Medical Problems Associated with Bacterial Biofilms

A.V. Lyamin, E.A. Botkin, A.V. Zhestkov

Samara State Medical University, Samara, Russia

This paper represents a review of currently available data on microbial communities and biofilms as an important clinical problem. Structure and morphology of microbial biofilm as well as stages and mechanisms of its formation, and genes and factors involved are described in detail. Available data on signal molecules (autoinducers) promoting «quorum sensing» phenomenon are provided. Known and suggested mechanisms of survival in bacterial biofilms, defense from the environmental factors

and increased antimicrobial resistance are also considered. The focus is made on potential targets which may be used to compromise biofilm formation or cause biofilm destruction. Studies to investigate effects of macrolides and combinations with other antibiotics on microbial biofilms are presented.

**Key words:** biofilm, adhesion, quorum sensing, autoinducers, resistance, antimicrobials, macrolides.

Выявление у микроорганизмов способности к образованию биопленок вызвало в последние годы значительный интерес, как среди микробиологов, так и среди значительной части специалистов в клинической медицине. Появление большого коли-

чества обзоров научной литературы и статей по этой теме позволило популяризировать информацию о биопленках среди врачей, подтолкнуло отечественных исследователей повысить активность в области изучения биопленок. Однако возрастающий объем информации привел к некоторому замешательству среди практикующих врачей при оценке роли биопленок в патологических процессах и значения выявления биопленок в клиническом материале.

Контактный адрес:  
Артем Викторович Лямин  
Эл. почта: avlyamin@rambler.ru

Недооценка микроорганизмов как живых существ, способных к сложноорганизованным взаимоотношениям, привела к тому, что на сегодняшний день отсутствуют клинические рекомендации, позволяющие четко регламентировать действия врача, направленные против сообщества бактерий.

Микробиологический принцип рациональной антимикробной химиотерапии основан на идентификации возбудителя и определении его антибиотикорезистентности перед назначением антимикробного препарата. Исследование микроорганизмов в практике врача на сегодняшний день определено постулатами Роберта Коха [1]. В соответствии с этими постулатами работа с чистой культурой не дает возможности наблюдать за бактериальными взаимодействиями и изучать их групповое поведение. Указанный принцип ограничивает антибиотикотерапию и не учитывает особенности сложного поведения микробов в организме хозяина.

В середине 2011 г. в Дании прошла вторая конференция ученых, изучающих феномен биопленок и биопленкообразования – «Eurobiofilms 2011». Она была организована Европейским обществом по клинической микробиологии и инфекционным болезням (ESCMID) [2]. Данное мероприятие продемонстрировало исключительную важность изучения микробных биопленок на современном этапе развития медицины. Значение биопленок в клинике является неоспоримым фактом, так как, по данным различных авторов, примерно 60–95% микроорганизмов, участвующих в инфекционном процессе, находится в виде микробных сообществ. Сложная организация микроорганизмов и проявление у них «социального» поведения также является фактом, не требующим развернутого доказательства. Результаты последних исследований позволяют сделать вывод, что мы только приблизились к пониманию фундаментальных принципов этого феномена. Большинство же современных исследований можно причислить к этапу эмпирического накопления знаний. Несомненно, в будущем мы подойдем к исчерпывающему пониманию этих процессов.

Несмотря на возросшее количество публикаций, посвященных вопросам микробных сообществ и биопленкообразования, нами было отмечено, что интерпретация термина «биопленка» среди клиницистов имеет в основном механическую трактовку и представляется как факт прикрепления микроорганизмов к поверхности с последующим образованием матрикса. Таким образом, формируется достаточно частое заблуждение о том, что «биопленка» – это просто слой, состоящий из бактерий и матрикса, покрывающий те или иные поверхно-

сти, который можно удалить механически или выявить, окрасив раневую поверхность или слизистые оболочки специальными веществами.

### **Биопленки: значение для бактерий**

Принципиальные механизмы выживания бактерий в виде биопленки, как правило, при этом отходят на второй план, хотя именно феномен «социального поведения» и межклеточной коммуникации является основополагающим. Данные механизмы ответственны за проявление большого числа специфических атрибутов биопленки, таких как сложная трехмерная организация и морфология, разнородность клеток популяции по экспрессии генов, дифференциация функций, синтез различных веществ и межклеточная коммуникация. Узкая трактовка данного термина с механистической точки зрения всего лишь отражает начальные этапы понимания этого сложного явления.

Адгезия является неотъемлемой частью патогенеза процессов, в которых участвуют микроорганизмы, и не всегда приводит к образованию биопленки. Адгезированные микроорганизмы не являются столь сложно организованной популяцией бактерий. Существует несколько общих характеристик, отличающих биопленки от адгезированных микроорганизмов:

- клетки соединены вместе посредством внеклеточного матрикса, состоящего из полисахаридов (но может включать белки, иногда нуклеиновые кислоты) [3];
- развитие биопленок происходит в ответ на внеклеточные сигналы, поступающие как из внешней среды, так и производимые самими микроорганизмами [4];
- образование биопленки является защитным механизмом от факторов агрессии внешней среды (ксенобиотиков) [5] и от иммунной системы человека [6].

Последнее отличие позволяет рассматривать способность к образованию биопленок как один из факторов патогенности, который реализуется в определенных условиях.

Как указывалось выше, в последнее десятилетие произошел скачок в понимании молекулярных механизмов образования биопленок. Исследования на единичных микроорганизмах позволили разработать общую модель формирования микробной биопленки. Эта модель после обобщения всех полученных данных показала, что образование биопленок у жгутиковых и безжгутиковых микроорганизмов проходит по-разному. У безжгутиковых форм (многие грамположительные микроорганизмы) первичным этапом является усиление синтеза

адгезинов и интегринов с последующим прикреплением к поверхности [7]. У жгутиковых и грамотрицательных бактерий адгезия к поверхности инициируется за счет ассоциации с поверхностью пилей IV типа (в некоторых случаях I типа) [8].

После прикрепления к поверхности бактерии проходят схожие этапы развития, хотя и с незначительными различиями в зависимости от принадлежности к конкретному виду. Эти этапы включают: образование монослоя клеток, переход к форме многослойных микроколоний (кластеров), синтез внеклеточного матрикса. На этих этапах происходят изменения в экспрессии генов и перестройка биохимических процессов в клетке. Наиболее хорошо эти процессы изучены у *Escherichia coli* [9–12], *Pseudomonas aeruginosa* [13, 14], *Bacillus subtilis* [15, 16], *Vibrio cholerae* [17], *Staphylococcus aureus* [18] и *Streptococcus pyogenes* [19].

Последним этапом является переход к истинной биопленке с формированием характерной трехмерной конфигурации, при этом у подвижных форм происходит потеря жгутиков и переход к стационарному существованию (рис. 1).

Первый интерес к образованию биопленок в медицине был обусловлен участием микроорганизмов в этой форме существования при развитии катетер-ассоциированного сепсиса [20]. Частые ссылки на первые работы по изучению биопленок сформировали еще один миф: биопленки образуются в основном на абиотических поверхностях и практически не имеют значения в естественных условиях организма. Дальнейшее исследование биопленок в медицине было продиктовано необходимостью изучения механизмов, ответственных за персистенцию микроорганизмов при хронических заболеваниях, а также резистентностью (толерантностью) их к антимикробным препаратам [8, 21, 22].

На сегодняшний день участие микроорганизмов в форме сложных сообществ (биопленок) в хронических инфекционных процессах является неоспоримым фактом. Несмотря на это, многие клиницисты требуют от микробиологов наглядного подтверждения наличия биопленок в клиническом материале или на поверхности медицинского оборудования, не учитывая тот факт, что микроорганизмы в естественных условиях практически всегда образуют биопленки, а любой патологический процесс с участием микроорганизмов начинается с их адгезии на клетках и тканях макроорганизма. В связи с этим выявление биопленок в клиническом материале сегодня играет роль лишь в научно-исследовательских целях.

Существует достаточно большое количество методов, позволяющих провести визуализацию сформировавшихся бактериальных пленок, среди них: электронная микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. При этом не учитывается, что образование биопленок как одного из факторов патогенности микроорганизмов реализуется в разной степени и его проявления зависят от экспрессии соответствующих генов. В первых работах, посвященных изучению образования биопленок, было показано, что степень адгезии и способность к пленкообразованию среди микроорганизмов одного вида, выделенных из разных источников, коррелирует со степенью вирулентности [23]. Позже в работах некоторых ученых была показана регулирующая связь факторов иммунной защиты и степени выраженности вирулентности микроорганизмов в организме человека при формировании биопленки [24, 25]. Методы изучения формирования биопленок *in vitro* позволяют выявлять такие особенности в зависимости от источника выделения, что может быть использовано в стационарах для оценки рас-

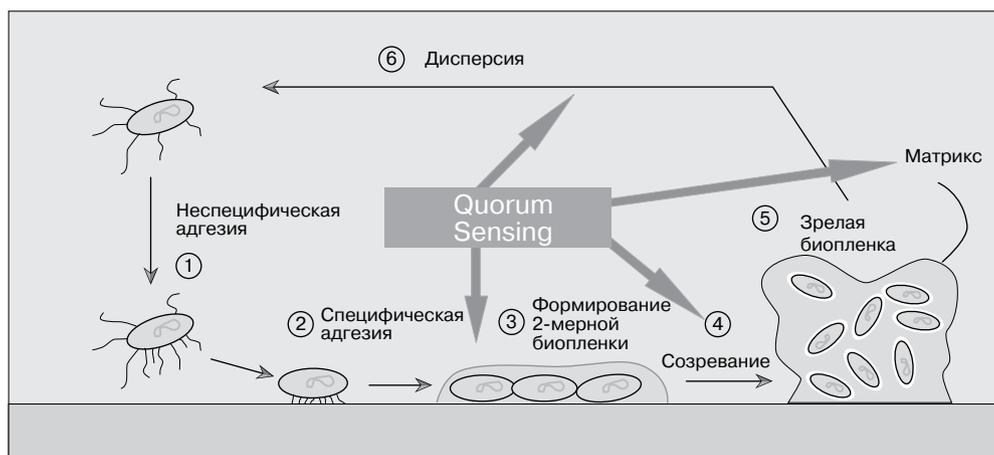


Рис. 1. Участие системы «Quorum Sensing» в цикле образования бактериальной биопленки.

пространности штаммов с повышенной способностью к образованию биопленок.

Сохранение микроорганизмов в биопленке, с одной стороны, обеспечивает выживание этих микробов и их распространение, а с другой стороны, является фактором, провоцирующим увеличение биомассы, которая сама по себе имеет большое медицинское и промышленное значение [26].

В ранних работах, посвященных изучению микробных сообществ, акцент исследователей был направлен на изучение морфологического строения и механизмов образования биопленки. Однако в последних исследованиях все большее внимание уделяют изучению факторов (генетических, физиологических, физических и химических), которые влияют на формирование и ингибирование биопленок [27–30].

Результатом этих исследований стало открытие сигнальной молекулы *c*-di-GMP – циклического дигуанилатмонофосфата, которая ответственна за переход бактерии из планктонной формы жизнедеятельности в стационарную форму (биопленкообразование) [31]. Также обсуждается роль других посредников и факторов, влияющих на формирование биопленок, таких как оксид азота (NO) [29], ионы железа ( $Fe^{3+}$ ) [32], pH [33] и др.

Последние достижения в изучении факторов, влияющих на развитие биопленки, свидетельствуют, что в большинстве случаев это динамический процесс, в котором общие экологические факторы, такие как концентрация нутриентов, температура, парциальное давление кислорода и осмолярность, имеют большое значение. Однако вклад различных факторов неоднороден и зависит не только от вида бактерий, но и от условий окружающей их среды, и на данный момент имеется больше вопросов, чем ответов. Также было показано, что стимуляция образования экзополисахаридного матрикса индуцируется многими антибиотиками в субингибирующих концентрациях [34].

Работа в области влияния различных факторов на жизнедеятельность микробного сообщества привела к введению в научный глоссарий термина *Quorum Sensing* (QS) – чувство кворума. Термин был введен при описании микробной сигнальной системы для самораспознавания, самоорганизации, контроля над функциями посредством специализированных молекул – аутоиндукторов [35]. К настоящему времени детально изучены несколько молекул, ответственных за QS у бактерий: лактон ацетилглюкозамин (AHL) [36], аутоиндуктор-2 (AI-2) [37], пептидные аутоиндукторы [38].

Изучение сигнальных молекул вызывает интерес, прежде всего, практической ценностью, так как

возможность влияния на QS и, в конечном счете, на биопленкообразование является важным фактором для улучшения терапии инфекционных заболеваний. Это связано с тем, что микроорганизмы в виде биопленки демонстрируют повышенную устойчивость к антимикробным препаратам и защитным механизмам иммунной системы [39–41].

### Механизмы выживания бактерий в биопленках

Генетические механизмы резистентности к антибиотикам бактерий в биопленках можно разделить на две общие категории: природные (естественные) факторы и индуцированные (приобретенные) факторы. Природные пути включают снижение диффузии антибиотиков через матрикс биопленки, снижение поступления кислорода и питательных веществ, которое сопровождается изменением метаболической активности и формированием клеток-персистеров, а также синтез специфических молекул. Различная концентрация антибиотика на поверхности биопленки и в глубинных слоях обуславливает бактерицидный эффект в отношении быстро растущих клеток (рис. 2). Индуцированные факторы сопротивления запускаются молекулой антибиотика и обладают большой вариабельностью. Внешний слой бактерий под воздействием достаточных концентраций антибиотика и ограниченным временем для адаптации быстро погибает. Вокруг бактерий, находящихся в нижних слоях биопленки, концентрация антибиотика значительно ниже, что индуцирует экспрессию специфических генов (рис. 3).

Большинство современных исследований направлено на преодоление устойчивости биопленки к антимикробным препаратам путем разработки новых методов лечения, направленных на дезорганизацию биопленки и уничтожение клеток-персистеров [26].

Проведенные исследования привели к выявлению нескольких молекул, которые эффективно нарушали образование биопленки, влияя на систему QS. Кроме выделения новых молекул, наруша-

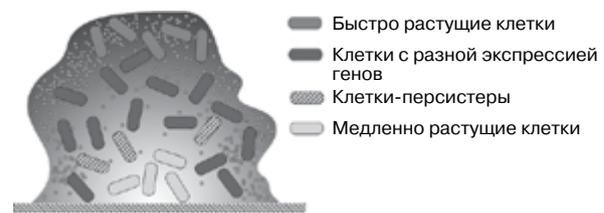


Рис. 2. Механизм природной резистентности бактерий в биопленке. Точками обозначены молекулы антибиотика.



**Рис. 3.** Механизм индуцированной резистентности бактерий в биопленке. Точками обозначены молекулы антибиотика.

ющих межклеточную сигнальную систему, проводится скрининг уже хорошо изученных соединений на предмет наличия у них действия на биопленки. К этим соединениям, прежде всего, можно отнести антимикробные препараты  $\beta$ -лактамовой группы, макролиды, аминогликозиды и некоторые другие.

В целом, вопрос резистентности биопленки требует отдельного рассмотрения. Было замечено, что чувствительность микроорганизмов к антибиотикам в планктонной фазе в 10–1000 раз выше, чем у микроорганизмов в составе биопленки [5]. Данный факт представляет серьезную медицинскую проблему, так как микроорганизмы в составе биопленки, сформированные в естественных условиях при хронических процессах, а также на медицинских имплантатах и оборудовании, существенно затрудняют терапию, значительно повышают ее стоимость и приводят к росту летальности. Часто единственным способом избежать серьезных нежелательных явлений в таких ситуациях является удаление имплантата [42]. В противовес этому, проведение эрадикации микроорганизмов в биопленке, образованной в очаге хронической инфекции, сопряжено с дополнительными трудностями. Ярким примером этого процесса могут служить пациенты с муковисцидозом. У таких больных в случае колонизации нижних дыхательных путей микроорганизмами с высокой степенью формирования биопленок прогноз существенно ухудшается [43–45]. Помимо муковисцидоза формирование биопленок имеет место практически при всех хронических инфекциях, что снижает эффект от антибактериальной терапии этих заболеваний.

Традиционные механизмы резистентности, хорошо изученные у микроорганизмов в планктонной фазе, включают: непосредственную инактивацию антибиотиков ферментными системами, изменение мишени действия, механизм эффлюкса и др. [46]. Многие из исследователей сходятся во мнении, что роль вышеперечисленных механизмов не является ведущей в условиях микробного сообщества. Было показано, что эффлюксный механизм резистент-

ности к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, используемый некоторыми микроорганизмами для защиты, в случае формирования микробных биопленок теряет свое первостепенное значение [46, 47].

Работы, проведенные разными авторами [5, 10, 26, 30, 31], позволяют предположить, что повышение резистентности связано, как минимум, с 4 главными факторами:

- матрикс биопленки может препятствовать диффузии, выполняя барьерную функцию;
- создание различных условий внутри микробного сообщества, например уменьшение концентрации кислорода в глубинных слоях биопленки, приводит к образованию медленно растущих микроорганизмов; изменение pH в глубинных слоях приводит к изменению концентрации ионизированной и неионизированной форм антибиотика, что влечет за собой изменение в степени его воздействия на клетки;
- дифференцирование микроорганизмов приводит к возникновению клеток-персистеров с пониженной чувствительностью к антибиотикам; так, в работе N. Kaldalu и соавт. было показано, что клетки-персистеры выживали после терапии некоторыми фторхинолонами [48];
- у микробов в составе биопленки происходит экспрессия специализированных генов, отвечающих за резистентность, которые не экспрессируются у планктонных форм. Наиболее ярким примером может служить исследование [49], в котором изучался ген *ndvB* у *P. aeruginosa*, ответственный за резистентность к тобрамицину. Этот ген отвечает за кодирование фермента, участвующего в синтезе циклического глюкана, он связывается с тобрамицином и не позволяет реализовать бактерицидное действие. Было доказано, что экспрессия этого гена наблюдается только у бактерий в составе биопленки.

Если говорить об индуцированной резистентности, то данная проблема имеет очень много нерешенных вопросов. Доступно небольшое количество публикаций, которые освещают результаты исследований на разных моделях. В ряде работ было показано, что индуцированная резистентность реализуется совместно с природными генетическими механизмами и приводит к экспрессии ряда генов [14, 50].

### Пути решения проблемы биопленок

Учитывая чрезвычайно сложные и малоизученные защитные механизмы микробной биопленки, разработка способов борьбы с ними и новых стратегий терапии, кажется сложной задачей. Тем не менее, исследователи обратили внимание на

потенциальные точки приложения и возможные способы решения этой проблемы. Особое внимание привлекают следующие факторы [26]:

- ингибиторы QS;
- ингибиторы, реализующие эффект не через систему QS;
- препараты, влияющие на адгезию;
- механическое (физическое) воздействие.

Работы в этой области привели к неожиданным результатам. Были открыты новые эффекты различных, казалось бы хорошо изученных, антимикробных препаратов на микробные биопленки. Иллюстрацией данного примера могут служить макролидные антибиотики.

В работе D.J. Wozniak, R. Keyser [51] было показано, что кларитромицин приводил к редукции пилей и ингибировал подвижность *P. aeruginosa* (следует обратить внимание, что кларитромицин не обладает активностью в отношении *P. aeruginosa*). Кларитромицин также изменял архитектуру биопленки. Этот факт указывает на возможность применения макролидов в комбинации с другими антибиотиками для эрадикации микробных биопленок. Еще раньше было отмечено, что применение макролидных антибиотиков у пациентов с муковисцидозом (и при ряде других нозологических форм) увеличивало продолжительность жизни [52].

Следует указать, что действие антибиотиков на биопленки весьма различается даже внутри одного класса, а сочетание антимикробных препаратов из разных групп может обладать весьма разнонаправленным действием. Так, в исследовании M. Tré-Hardy и соавт. [53] при изучении влияния сочетания тобрамицина с различными макролидами было продемонстрировано увеличение эффективности за счет синергизма комбинации тобрамицина с кларитромицином. В противоположность этому, сочетание тобрамицина с азитромицином не демонстрировало синергизма, а в некоторых случаях даже приводило к антагонизму.

На механизм синергизма макролидных антибиотиков с другими антимикробными препаратами также указывают результаты исследования O. Kandemir и соавт. [54] при моделировании остеомиелита у животных. Данный эффект, по всей видимости, можно использовать и для терапии других патологических процессов с участием микроорганизмов, образующих биопленки.

Механизм синергизма пока не совсем понятен, однако в работах H. Yasuda и соавт. [55, 56] было показано, что кларитромицин уменьшал содержание экзополисахаридов в матриксе биопленок и повышал концентрацию гексоз внутри клеток, увеличивая диффузию офлоксацина.

Данные примеры указывают на необходимость пересмотра принципов фармакотерапии инфекционных заболеваний и углубленное изучение влияния комбинаций антимикробных препаратов на микробные сообщества.

## Заключение

Бактериальная биопленка – сложноорганизованная форма существования адгезированных бактерий, продуцирующих внеклеточный матрикс, находящихся в разной степени дифференцировки по физиологическим, морфологическим, генетическим признакам, жизнедеятельность которых регулируется межклеточными сигнальными молекулами. Присутствие всех вышеперечисленных признаков является характерным именно для биопленки, а отсутствие хотя бы одного из них свидетельствует лишь о разной степени адгезии бактерий на абиотических и биотических поверхностях, и как следствие у бактерий в такой форме существования не будут реализовываться все атрибуты, характерные для биопленок.

Образование биопленок доказано у большинства микроорганизмов, различия заключаются лишь в степени выраженности процесса. По этой причине поиск биопленок в организме человека в рутинной практике является нецелесообразным, равно как и выявление антибиотикорезистентности микроорганизмов в организме пациента (*in vivo*). Практическое значение, возможно, имеет определение степени способности микроорганизмов образовывать биопленки в зависимости от источника выделения, но на сегодняшний день для этого отсутствуют стандартизированные методики. Это своего рода аналог определения антибиотикорезистентности *in vitro*, когда врач использует полученные данные после соответствующей оценки.

Фундаментальные различия в физиологии и генетике планктонных форм бактерий и бактерий в составе биопленки диктуют необходимость пересмотра подходов к диагностике и терапии патологических процессов, сопряженных с образованием биопленок. Существует множество различных мнений по поводу терапии инфекций, в патогенезе которых участвуют бактерии в составе биопленки. С большой уверенностью можно утверждать, что в ближайшее время будут пересмотрены точки приложения многих антимикробных препаратов, к известным механизмам будут добавлены новые, влияющие не только на изолированные бактерии, но и на микробные сообщества.

Макролиды стали одной из первых групп препаратов, у которых были обнаружены эффекты, оказывающие действие на формирование биопле-

нок. Накопленные данные показывают перспективу проведения дальнейших работ в направлении поиска препаратов, оказывающих воздействие на элементы биопленки. Различная степень эффектов

от применения препаратов даже внутри одной группы позволяет более широко взглянуть на проблему биопленок в клинической медицине.

## Литература

1. Kaufmann S.H.E., Schaible U.E. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends in Microbiology* 2005; 13:469-75.
2. Jensen P.Ø., Tolker-Nielsen T. Report from Eurobiofilms 2011. *Future Microbiol* 2011; 6:1237-45.
3. Branda S.S., Vik S., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13:20-6.
4. Spoering A.L., Gilmore M.S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9:133-7.
5. Mah T.F., O'Toole G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 2001; 9:34-9.
6. Leid J.G. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* 2005; 175:7512-8.
7. Götz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43:1367-78.
8. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annl Rev Microbiol* 2000; 54:49-79.
9. Prüss B.M. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J Bact* 2006; 188:3731-9.
10. Ren D. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64:515-24.
11. Beloin C. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 2004; 51:659-74.
12. Schembri M., Kjaergaard K., Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 2003; 48:253-67.
13. Waite R.D. Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC Genomics* 2006; 7:162.
14. Whiteley M. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001; 413:860-4.
15. Ren D. Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance of yveR for biofilm maintenance. *Biotechn Bioeng* 2004; 86:344-64.
16. Stanley N.R. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* 2003; 185:1951-7.
17. Moorthy S., Watnick P.I. Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol* 2005; 57:1623-35.
18. Beenken K.E. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004; 186:4665-84.
19. Cho K.H., Caparon M.G. Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 2005; 57:1545-56.
20. O'Grady N.P., Alexander M., Dellinger E.P., et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR. Recommendations and reports : morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports. Centers for Disease Control* 2002; 51(RR-10):1-29.
21. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182:2675-9.
22. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-22.
23. Zhu J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Nat Acad of Sci USA* 2002; 99:3129-34.
24. Irie Y., Mattoo S., Yuk M.H. The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 2004; 186:5692-8.
25. Kuchma S.L., Connolly J.P., O'Toole G.A. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2005; 187:1441-54.
26. Compans R.W., Cooper M.D. *Current Topics in Microbiology and Immunology. Series Editors. Vol. 322; Curr Top Microbiol Immunol.*
27. Picioareanu C., van Loosdrecht M.C., Heijnen J.J. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechn Bioeng* 2001; 72:205-18.
28. Barraud N., Hassett D., Hwang S., et al. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2006; 188:7344-53.
29. Barraud N., Hassett D., Hwang S., et al. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* 2009; 191:7333-42.
30. Huang C.T. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl Environm Microbiol* 1998; 64:1526-31.
31. Jenal U., Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Ann Rev Genetics* 2006; 40:385-407.
32. Heidelberg J.F. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnol* 2002; 20:1118-23.
33. Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol mol biol rev: MMBR* 2002; 66:373-95.
34. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artificial Org* 2011; 34:737-51.
35. Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-

- responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; 176:269-75.
36. McDougald D., Rice S.A., Kjelleberg S. Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387:445-53.
37. Vendeville A. Making "sense" of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 2005; 3:383-96.
38. Steinmoen H., Knutsen E., Håvarstein L.S. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; 99:7681-6.
39. Jesaitis A.J. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* 2003; 171:4329-39.
40. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews. Drug Discovery* 2003; 2:114-22.
41. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:999-1007.
42. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93.
43. Høiby N., Frederiksen B., Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2005; 4(Suppl 2):49-54.
44. Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2003; 168:918-51.
45. Chernish R.N., Aaron S.D. Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Curr Opinion Pulm Med* 2003; 9:509-15.
46. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthopaed Rel Res* 2005; 437:41-7.
47. Stewart P.S., Costerton J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-8.
48. Kaldalu N., Mei R., Lewis K. Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:890-6.
49. Mah T.-F. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003; 426:306-10.
50. Bagge N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1175-87.
51. Wozniak D.J., Keyser R. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 2004; 125 (Suppl.):62S-69S.
52. Tré-Hardy M. Evaluation of long-term co-administration of tobramycin and clarithromycin in a mature biofilm model of cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:370-4.
53. Tré-Hardy M., Nagant C., El Manssouri N., et al. Efficacy of the combination of tobramycin and a macrolide in an *in vitro Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4409-15.
54. Kandemir O., Oztuna V., Milcan A. Clarithromycin destroys biofilms and enhances bactericidal agents in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis. *Clin Orthopaed Related Research* 2005; (430):171-5.
55. Yasuda H., Ajiki Y., Koga T., Kawada H., Yokota T. Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1749-55.
56. Yasuda H., Ajiki Y., Koga T., Yokota T. Interaction between clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:138-41.