



УДК 578.81

## Бактериофаги и их функционирование в биоплёнках

В. В. Дрюккер, А. С. Горшкова

*Лимнологический институт СО РАН, Иркутск*  
E-mail: [drucker@lin.irk.ru](mailto:drucker@lin.irk.ru)

**Аннотация.** В настоящее время чрезвычайно актуальными и малоизученными направлениями в биологической науке являются исследования бактериофагов (вирусов бактерий), а также природных и искусственных биоплёнок, образующихся повсеместно на различных субстратах, в организме человека и животных. В статье приводится современный обзор литературы по взаимодействию бактериофагов с биоплёнками различного происхождения.

**Ключевые слова:** классификация бактериофагов, структура биоплёнок, внедрение и функционирование фагов в биоплёнках, фаги против биоплёнок, методы изучения биоплёнок.

### *Введение*

Согласно современным представлениям большинство микроорганизмов – хозяев фагов, существуют в окружающей среде в виде специфически организованных, прикрепленных к субстрату биоплёнок, формирующихся на поверхности раздела различных фаз: воздух – вода, вода – донные отложения, вода – геологические породы и другие [34]. В последнее время в морях и океанах установлена более высокая в сравнении с бактериями численность автохтонных вирусных частиц – до  $10^8$  частиц/мл [28]. Уже выяснено, что вирусы морских микроорганизмов, входящие в состав планктона и бентоса, играют ключевую роль в контроле численности и видового многообразия своих хозяев, и определяют формирование сложных микробиоценозов [51]. Бактериофаги найдены также и в пресноводном олиготрофном водоёме – оз. Байкал, и являются, таким образом, новым трофическим звеном в его экосистеме [1–3].

Бактериофаги (фаги) – вирусы бактерий и при встрече со специфической клеткой в самых различных условиях происходит её разрушение [4; 5; 7; 32]. Классификация фагов по действию на бактерии показывает большое разнообразие их взаимоотношений: литическое заражение, лизогенное заражение, подавление лизиса, хроническое заражение, псевдолизогенное заражение и другие формы, которые будут описаны в обзоре.

В настоящее время имеется много определений биоплёнок – обычно они представляют собой сложные агрегаты микроорганизмов,

прикрепленные к инертным поверхностям, и включают продукты их жизнедеятельности [6; 47]. Это сложные динамические структуры, в которых происходят различные метаболические процессы, а также взаимодействие между клетками и их компонентами. В природной среде – это смешанные микробные сообщества, где в основном преобладают прокариоты, но встречаются и эукариоты. Лизис бактериальных клеток в биоплёнках может происходить как естественным путём при их старении, так и при взаимодействии с бактериофагами. Когда фаг вступает в контакт с биоплёнками, дальнейшие взаимодействия происходят в зависимости от восприимчивости бактерий биоплёнки к фагу и наличию рецепторных участков. Если бактериофаг также обладает ферментами, разлагающими полисахариды, либо осуществляет лизис микробных клеток, то целостность биоплёнки может быть быстро нарушена. Однако может сложиться и сосуществование между фагом и бактериями-хозяевами внутри биоплёнки. Хотя бактериофаг был предложен в качестве средства разрушения или контроля существования биоплёнок, успешных и эффективных разработок в области таких технологий пока нет.

### *Классификация фагов по функциональному отношению к бактериям и их взаимодействию*

Различают «природные» и «искусственные» биоплёнки [37]. Природные биоплёнки обычно образуются на естественных поверхностях, в то время как искусственные создаются в

экспериментальных условиях. Хотя найдено относительно большое количество фагов в средах, где формируются биоплёнки, и несмотря на то, что число исследований микробных биоплёнок быстро растёт, только немногие из них посвящены воздействию бактериофага на бактерии этих смешанных микробных сообществ. Сейчас исследования ведутся с целью выяснения взаимодействия *in vitro* между фагами и биоплёнками, состоящими из бактерий одного вида, а также с биоплёнками из большего количества видов. При любом изучении этих взаимодействий следует учитывать вопрос доступа частиц вируса к поверхности клеток-хозяев. *Bdellovibrio* может достигать бактериальной клетки [31], но у фага нет движущих механизмов этой хищной бактерии.

В настоящее время известны следующие функциональные типы бактериофагов и виды инфекций, вызываемых ими [6]:

- облигатный литический фаг – при заражении не способен оказывать лизогенное заражение;
- умеренный фаг – может оказывать либо продуктивное, либо лизогенное заражение;
- нитчатый фаг – по морфологии длинный и тонкий и оказывает хроническое продуктивное заражение;
- хвостатый фаг – фаг, имеющий головку с ДНК, и прикрепляющийся к бактерии хвостом; оказывает литическое продуктивное заражение;
- профаг – фаговый геном, который может существовать либо внедрённым в бактериальные хромосомы, либо как плазмиды в цитоплазме;
- выход фага – лизис зараженной фагом бактерии, выделяющей свободные фаги; величина выхода их – это число вышедших фагов;
- хроническое заражение фагами – это продуктивное фаговое заражение, когда инфекция бактерии не прекращается, а фаговые частицы продуцируются; хронические фаговые инфекции не являются лизогенными, хотя продуктивный цикл небольшого числа умеренных фагов является скорее хроническим, чем лизисным;
- деструктивная инфекция фагами – фаговое заражение, когда фаг инактивирован так, что не происходит ни продуктивного, ни редуцированного заражения;
- немедленное литическое заражение фагами – фаговое заражение, которое сразу вступает в литический цикл (противоположность лизогенному и индуцированному литическому заражению);
  - индуцированное литическое заражение – литическое заражение, которое следует за индукцией лизогенного заражения (противоположность немедленному литическому заражению и индуцированному хроническому заражению);
  - индуцированное продуктивное заражение – продуктивное заражение, следующее за индукцией лизогенного заражения; для большинства фагов эти инфекции являются литическими, хотя для умеренных нитчатых фагов они являются хроническими;
  - лизогенное заражение – редуцированное заражение, которое приводит к последующей репликации генома фага (в виде профага) без образования дочерних фагов;
  - литическое заражение – лизис клеток-хозяев в конце латентного периода с целью выброса внутриклеточных фаговых частиц;
  - подавление лизиса – продление нормального латентного периода, вызванного вторичной адсорбцией подобным фагом;
  - продуктивное заражение – фаговое заражение, которое напрямую ведёт к образованию фаговых частиц; последующие образовавшиеся фаговые частицы могут выходить либо литически, либо хронически;
  - псевдолизогенное заражение – фаговое заражение, при котором начало продуктивного либо лизогенного заражения запаздывает и во время которого не происходит репликации фагового генома;
  - редуцированное заражение – фаговое заражение (не продуктивное) не разрушительное, т. е. лизогенное или псевдолизогенное;
  - суперинфекция – фаговое заражение уже заражённой фагом бактерии; исходное заражение может быть продуктивным, редуцированным и даже разрушительным;
  - вторичная адсорбция – присоединение (поглощение) фага к уже заражённой фагом бактерии; она может привести, но может и не привести к суперинфекции;
  - множественность заражения – отношение поглощённых или заражающих фагов к общему числу бактерий;
  - устойчивость к суперинфекции – предотвращение умеренного фагового заражения лизогена при посредстве профага того же (или подобного) типа;
  - лизоген – бактерия, содержащая фаг, оказывающий лизогенное заражение по типу профага;

- факультативный хозяин – бактерия, которая может поддерживать продуктивное фаговое заражение; неудача в поддержке инфекции может произойти либо из-за генотипа бактерии, либо из-за её физиологического состояния.

Данную подробную классификацию необходимо представить первоначально, поскольку именно она используется в современной научной литературе, посвящённой бактериофагам и биоуплёнкам, преимущественно зарубежной.

### ***Состав и структура биоуплёнок***

В окружающей нас природной среде, наряду с повсеместным распространением микробных клеток, содержится и ряд макромолекулярных продуктов, выделяемых этими клетками. Наряду с микробными клетками, матрикс биоуплёнок также содержит ряд макромолекулярных продуктов, в которых экзополисахариды (ЭПС) являются преобладающим производным компонентом, в то время как содержание воды составляет около 90–97 % [53]. Межклеточный матрикс биоуплёнок состоит из экзополисахаридов различной природы и зависит от состава микробного сообщества, участвующего в его создании. Кроме того, продукты жизнедеятельности клеток включают в себя различные ферменты, другие белки, бактериоцины, растворённое вещество с малой массой, а также нуклеиновую кислоту, выделяемую при лизисе клетки. Структура биоуплёнок зависит от многих факторов: состава микроорганизмов, их физиологического состояния, окружающей среды (линейный или турбулентный поток), характера поверхности, к которой прикреплены клетки [45; 46].

Таким образом, биоуплёнка представляет собой динамическую среду, внутри которой микробные клетки остаются в основном жизнеспособными и метаболически активными, хотя это зависит от их положения внутри биоуплёнок. Бактерии, составляющие биоуплёнку, могут структурно реорганизовываться в ответ на смену физиологических условий [40]. Клетки, экспрессирующие специфические функциональные гены в пределах специфических микросред в биоуплёнке, могут обеспечивать и оптимальное использование источников питательных веществ [48]. Применение специфических методов, таких как маркировка зелёным флуоресцентным протеином, позволяет определять типы клеток [11; 26], в то время как маркированные лектины также могут определять наличие и расположение некоторых моносахаридных и углеводных структур [35].

### ***Взаимодействие фагов и биоуплёнок***

Взаимодействие фагов с биоуплёнками можно различать по категориям. Например, фаги вместе с другими вирусами могут быть неспецифически захвачены внутрь внеклеточных полимерных субстанций биоуплёнок, могут разрушать эти полимеры, инфицировать бактерии, пополняя биоуплёнку, и заражать планктонные бактерии, которые могли бы продолжить образование биоуплёнок.

В свою очередь, биоуплёнки могут оказывать сопротивление заражению фагами. Биоуплёнки могут действовать как фильтры: предположительно, они позволяют частицам проникать в гелеобразный внеклеточный матрикс биоуплёнок, далее идёт медленное продвижение внутри их, а также более медленная диффузия за пределы матрикса в водную массу [37].

В настоящее время существуют несколько теорий взаимодействия вирусных частиц и биоуплёнок, две из которых наиболее признаны.

Согласно первой теории, движение фагов и проникновение их в биоуплёнки зависит от концентрации самих частиц: более высокие плотности свободных частиц в массе потока, окружающего биоуплёнку, приводят к более высоким скоростям столкновения между частицами, движущимися внутрь и наружу. Это явление можно рассматривать как эквивалент задержке коллоидных веществ при геле-фильтрации. Особенно наглядно это проявляется, если применить объём образца, больший, чем может принять матрикс, так что градиенты концентрации больше не способствуют движению частиц из несущего буфера в матрикс. Способность биоуплёнок удалять вирусы из водной среды подобным образом должна частично зависеть от количества биоуплёнок [34].

Вторая теория предполагает, что движение частиц может замедляться при входе в матрикс биоуплёнок [38; 39; 43] и также опирается на результаты экспериментов по эксклюзионной хроматографии. Действительно, частицы могут случайным образом диффундировать по матриксу биоуплёнок и образовывать слабые (и неспецифические) химические соединения с материалами биоуплёнок так же, как фаги могут неспецифически соединяться с различными субстанциями из почвы (глина, гумус). Частицы могут проникать также и в каналы биоуплёнок, которые быстро закрываются вследствие размножения бактерий.

Возможный результат сочетания этих механизмов таков: вирусы легко проникают в

биоплёнки, но покидают их всегда медленно. Фактически, вирусы проявляют своего рода кинезию (движение, активность) относительно биоплёнок. Биоплёнки, замедляя движение частиц по сравнению с водной массой, могут таким образом неспецифически накапливать вирусы.

Вирусы могут быть неспецифически захвачены внутри биоплёнок на значительный период (на недели, месяцы, а то и годы). Существуют определённые условия среды, влияющие на способность биоплёнок служить резервуаром для вирусов [37]. Так, более высокие концентрации вирусов в водной среде вместе с более высокими скоростями присоединения к биоплёнкам должны повысить скорость захвата вирусов. Проникновение фагов в биоплёнки может происходить в больших объёмах и в короткий срок, если фаги не способны адсорбироваться на специфические бактерии, составляющие биоплёнку, так как адсорбция фагов на специфичные бактерии предотвращает процесс диффузии фагов [52]. Образующаяся на биоплёнках внеклеточная полимерная субстанция не может быть абсолютным барьером для диффузии фагов [19], но внутри биоплёнок она может замедлять движение вирусов. Это приводит к более медленному поступлению фагов к специфичным бактериям. Фаги также могут быть захвачены внутри биоплёнки другими бактериями, если в ней нет бактерий, восприимчивых к данным фагам.

Фаги могут повысить свою мобильность при встрече с полимерной субстанцией путём выработки разрушающих её деполимераз [13; 28; 42; 47]. Некоторые авторы считают, что фаги, использующие внеклеточные деполимеразы, должны разрушить достаточную часть матрикса, чтобы сделать уязвимыми погружённые в биоплёнку бактерии. Способность распознавать специфические внеклеточные полимеразные субстанции ферментативно также должна позволить фагам легче достигать биоплёнки, потенциально содержащие восприимчивые бактерии [30; 50], т. е. связываться с этими биоплёнками и входить в них. Недостатком в применении этих ферментов, как с экологической точки зрения, так и в свете их применения для разрушения биоплёнок, является разнообразие полимеров, найденных в биоплёнках в сочетании с обычно высокоспецифичными фаговыми деполимеразами.

У многих биоплёнок есть открытые структуры с каналами, наполненными водой, которые позволили бы фагам проникнуть внутрь биоплёнки. Конфокальная лазерная сканирующая

микроскопия и подобные методы показали микрогетерогенность биоплёнок с различным распределением клеток, матриц, каналов и пор, заполненных жидкостью [12]. Так как биоплёнки стареют, а клетки отмирают и отторгаются, могут появиться новые участки проникновения вирусов. Имеются наблюдения [23], что в нижних частях биоплёнок могут захватываться частицы размером с вирусы и концентрироваться там в стократно превышающем по сравнению с окружающей водной составляющей количестве. Тем не менее, выживание этих инертных частиц на протяжении более семи месяцев необязательно подразумевает такое длительное выживание бактериофагов. Можно ожидать высвобождения фагов по достижении местного лизиса восприимчивых клеток и разложения соответствующими ферментами ЭПС внутри биоплёнки. Еще один фактор, который мог бы повлиять на задержку фага внутри биоплёнки – это роль гидрофобных и электростатических взаимодействий. При взаимодействии коли-фага как с гидрофобными, так и с гидрофильными мембранами критическим фактором в удержании фага является его изоэлектрическая точка [49].

Независимо от того, вырабатывали фаги полисахариды или нет, масштаб поглощения вирусов и проникновение в бактерию-хозяина будет зависеть от многих факторов, связанных с физиологическим состоянием хозяина. Можно допустить, что многие бактерии внутри биоплёнки будут представлять собой субоптимальные среды для инфицирования и роста фагов [14]. Многие вирусы могут легко проникать в биоплёнку, однако их жизнедеятельность внутри биоплёнок и взаимодействие с находящимися там бактериями происходит, по видимому, различными путями. С одной стороны, они могут не встречать препятствия со стороны полимерных субстанций самой биоплёнки, а с другой – крупные фаги с относительно длинными хвостами могут быть менее способны внедряться и мигрировать внутри биоплёнки [24]. Таким образом, в некоторой степени можно предотвращать легкое проникновение фагов к восприимчивым бактериям, находящимся в биоплёнке [47]. К тому же неспецифическая диффузия вирусов в биоплёнку может подавлять поиск фагом конкретных бактерий. В крайнем случае фаг может быть захвачен внутри биоплёнки, которая не содержит восприимчивых к нему бактерий.

Установлены три категории гидролитических ферментов, кодируемых фагами, которые способны влиять на биоплёнки [30; 54]:

1) ферменты, подвергающие гидролизу внеклеточные полимерные вещества биоплёнки;

2) ферменты, разрушающие капсулу бактериальной клетки;

3) ферменты, разрушающие клеточную стенку бактерий.

Любой из этих ферментов может быть применён для намеренного уничтожения биоплёнок. Ферменты, разлагающие структурную матрицу биоплёнок, могут позволить фагам более эффективно двигаться к бактериям и заражать их. Ферменты могут повлиять и на обратное движение фагов от уже заражённой бактерии (выход фагов из инфицированной бактерии) в вышележащий поток, в том числе вне самой биоплёнки. Основу матрикса биоплёнки может составлять ДНК [21] и известен, по крайней мере, один фаг, кодирующий ДНК-азу, функция которой состоит в разрушении этой ДНК, по-видимому, для обеспечения большей скорости движения фага по матриксу [16].

Ферменты, которые разлагают материал бактериальных капсул, должны облегчить движение фага к отдельным и сопряжённым бактериям. В этой роли барьеры ВПС могут служить рецепторами фагов, снабжённых такими ферментами [30; 33; 50]. Ферменты, которые разлагают клеточную стенку бактерии (фаговый эндоллиз), обычно помогают фагам выйти из заражённой бактерии во время обычного бактериального лизиса. Они могут убивать грамотрицательные и грамположительные бактерии [15; 20; 22; 27; 36], поэтому могут применяться против биоплёнок [41].

Инфицирование фагами биоплёночных бактерий может идти по продуктивному пути (вероятно, наиболее часто встречающемуся), а также по лизогенному и редуکتивному. Продуктивное заражение начинается с поглощения фага и заканчивается выбросом потомства фага после латентного периода. Такая быстрая продуктивность может иметь место при заражении умеренными фагами, неспособными к лизогении нитчатými фагами и облигатно литическими фагами. Лизогенный путь встречается, когда индуцируется продукция профага у бактерий биоплёнки. В данном случае не требуется наличие ферментов, деградирующих экзополисахариды.

Альтернативой продуктивным инфекциям является редуکتивная, когда происходит инфицирование бактерий биоплёнки умеренным фагом до лизогении. Относительно образующих биоплёнки бактерий неясно, преобладает ли это редуکتивное заражение в отношении

планктонных бактерий, еще не образовавших биоплёнку, или же действуют на бактерии, уже образовавшие биоплёнку. В любом случае, редуکتивное заражение планктонных бактерий менее вероятно приведёт к образованию биоплёнки, чем редуکتивное заражение бактерий, уже образующих биоплёнку.

Умеренные фаги при различных условиях в основном осуществляют продуктивную инфекцию, лишь частично проявляя редуक्तिю до лизогении [10; 25]. Эта тенденция объясняет, почему умеренные фаги могут частично редуکتивно инфицировать хозяина, образуя бляшки с мутным центром, являющиеся результатом лизогенизации на ранней стадии формирования бляшки [44]. Следствием такой продуктивной литической инфекции может быть распад биоплёнки. Она может содержать образующиеся лизогенные бактерии, у которых свойство поддерживать изначальную биоплёночную ассоциацию снижено. Другими словами, нет гарантии того, что взаимодействие умеренного фага с бактериями биоплёнки приведёт к её сохранению за счёт образующихся лизогенов. Вероятно также, что более глубоко находящиеся, менее метаболически активные и/или многократно адсорбируемые бактерии могут быть лучше закреплены в биоплёнке и с большей вероятностью являться хозяевами заражений, вызывающих лизогению [25; 17]. Поэтому важен вопрос: являются ли лизогены бактерий, образующих биоплёнки, в основном первично образовавшимися внутри биоплёнок? Если да, то как долго после образования эти инфекции остаются связанными с биоплёнками?

Относительно продуктивных заражений, если свободные фаги встречают восприимчивых хозяев внутри биоплёнок, например, собранных в микроколонию, то множественные бактерии будут доступны для местного заражения. Такой же возможности может не быть у фагов, выделившихся из лизогенов путём индукции. Причина в том, что лизогены стремятся иметь иммунитет к заражению теми же типами фагов, которые они могут вырабатывать. Этот иммунитет не препятствует адсорбции фагов, но блокирует последующее заражение, а значит бактерии, клонально родственные внедренному лизогену, не послужат факультативными хозяевами. Поэтому внутри биоплёнки не может быть дополнительных бактерий для успешного заражения по соседству с внедренными умеренными фагами, если только похожие, но не родственные клонально типы бактерий не имеют тенденции скапливаться в тех же

местах по причинам экологического плана. В крайнем случае биоплёнка, состоящая из клоноально родственных лизогенов, будет содержать мало или вообще не будет содержать бактерии, которые могут послужить последующими хозяевами фаговых частиц внедренных лизогенов.

Таким образом, существует много путей, следуя которым фаги могут заразить бактерии, живущие в биоплёнках. Более того, успешная последующая инфекция фагом, образовавшимся в биоплёнке, совершенно не гарантирована. Действительно, трудно понять, происходит ли инфекция биоплёнок фагами в естественной среде? Потенциальным недостатком таких заражений может быть весьма большое разнообразие фагов и бактерий при том, что диапазон хозяев фага часто относительно узок [30]. Если фаги не могут распознать специфические бактерии до внедрения в биоплёнку, либо специфических бактерий очень много, то первая встреча отдельного фага с отдельной биоплёнкой может и не вызвать заражения. Поэтому можно предсказать, что немедленное продуктивное заражение фагом в природных биоплёнках может быть относительно редким.

Что касается вопросов экологической полезности влияния фагов на биоплёнки и полученных экспериментальных результатов, то авторы исследований сходятся во мнении, что это процесс неоднозначный. Экологическая полезность может выступать либо с точки зрения жизненного цикла фага, т. е. вероятности распространения фагов и достижения бактерий, не заражённым этим фагом, либо с точки зрения выживания и воспроизводства лизогена [8; 29].

### **Фаги против биоплёнок**

Особо стоят вопросы практического использования фагов для удаления биоплёнок. Эффективность разрушения биоплёнок с помощью фагов, как показали исследования многих авторов, может быть значительна, тем более, если направлять фаги не на среду, а непосредственно на биоплёнку. Здесь могут применяться как активные, так и пассивные способы обработки. Если низкие концентрации фага не приводят к полному или хотя бы частичному удалению биоплёнки, необходимо применение более высоких его доз. Указывается [9], что для пассивной обработки биоплёнок должны применяться концентрации не менее  $10^8$  фагов/мл, а во многих случаях могут потребоваться и более высокие дозы. Иногда при применении фагов как антибактериальных средств удаётся достичь высокого эффекта. Фаги мож-

но вносить в биоплёнку в достаточно больших количествах для достижения полного заражения и уничтожения бактерий – это и есть пассивная обработка. Напротив, при активной обработке биоплёнки для прямого достижения антибактериального эффекта требуется значительно меньше фагов. Пассивную обработку можно проводить посредством фагов, изменённых так, чтобы они не могли произвести продуктивное заражение. В некоторых случаях пассивную обработку можно реализовать, используя столько фагов, чтобы бактерии были буквально лизированы. Как минимум при пассивной обработке добавляется столько фагов, сколько необходимо для достижения желаемого уровня гибели бактерий биоплёнки, не считывая на пополнение фагов, образующихся при репликации *in situ* внутри биоплёнки. При пассивной обработке гибель биоплёнки – лишь функция скоростей поглощения фага и, возможно, вытекающих из этого скоростей лизиса (для активного проникновения фагов). При активной обработке фаги должны дать достаточно потомства для заражения (большое количество выхода) при высокой их активности.

Таким образом, активная обработка биоплёнок требует более высокой активности фагов при росте их популяции. Различные ВПС биоплёнок, атакующие ферменты, могут применяться в сочетании с фагами, либо для запуска процесса проникновения фагов, либо для расширения спектра бактерий или биоплёнок, против которых может быть эффективен тот или иной ингредиент воздействия. При уничтожении биоплёнок нет особых разногласий авторов между активным и пассивным способами обработки. Это связано с тем, что при обнаружении сформировавшейся биоплёнки плотности бактерий уже относительно высоки, и подразумевается, что существует хотя бы небольшая возможность амплификации фага до плотностей, достаточных для контроля за биоплёнками.

### **Методы изучения биоплёнок**

Очевидно, исследование прикреплённых к различным поверхностям (прозрачным, а чаще – непрозрачным) биоплёнок, в состав которых входят микроскопические и ультрамикроскопические организмы, чрезвычайно сложно. Тем более, что требуется напрямую наблюдать поведение микроорганизмов: адгезию, рост, биоплёночное развитие, отделение от поверхности, лизис под действием фагов [6]. Большая часть таких исследований включает в себя использование микроскопии проходящего и па-

дающего света, трансмиссионной (ТЭМ) и сканирующей (СЭМ) электронной микроскопии. Во время ранних стадий заселения поверхностей, особенно если стеклянные, пластиковые, металлические или деревянные пластинки погружаются в водную среду, бактерии, крепко прилипшие к поверхности, могут культивироваться при отмывании пластинок для того, чтобы удалить слабо прикрепленные организмы для последующего расположения предметного стекла на поверхности чашки с подходящей агаровой средой. В последующих исследованиях возможно использование следующих методов:

- погружённая микроскопия;
- капиллярная микроскопия;
- компьютерно-усиленный анализ изображения;
- микроскопия интерференционного отражения;
- микрокультура диализа;
- почвенные плёнки;
- просвечивающие секции в трубчатых реакторах;
- световая микроскопия разреза;
- измерение радиоактивности, следующее за потреблением меченых субстратов;
- автордиография;
- определение АТФ для общей биомассы;
- определение мурамовой кислоты для бактериальной биомассы;
- характеристика фосфолипидной жирной кислоты;
- 16S рРНК секвенирование;
- инфракрасная спектроскопия;
- конфокальная сканирующая лазерная микроскопия.

Применение в последнее время конфокальной сканирующей лазерной микроскопии для исследований биоплёнок и происходящих в них процессов радикально изменило понимание их структуры, функций и механизмов взаимоотношений составных частей, поскольку даёт возможность неагрессивной, трёхмерной визуализации и компьютерного воссоздания полностью гидратированной и зрелой биоплёнки.

### **Заключение**

Является очевидным, что в настоящее время не всё понятно в процессах формирования микробных биоплёнок, образования и состава внеклеточной полимерной субстанции, взаимодействий бактерий с фагами, тем более, что они происходят в микроскопических масштабах. Взаимодействие фагов с биоплёнками может быть намного сложнее, чем нам может представляться: биоплёнки могут захватывать

неспецифические фаги или изменять активность профагов, найденных внутри соответствующих бактериальных лизогенов. Биоплёнки обычно состоят более чем из одного вида бактерий, тем самым усложняя выводы о наличии бактерий для фагов локально внутри биоплёнки. Не ясными остаются и ключевые моменты в процессах взаимодействия фагов с биоплёнками: биология и экология самих фагов, процессы моделирования роста фаговых популяций в полутвёрдых средах и др. Важно изучить взаимодействие фагов с биоплёнкой и проникновение их внутрь биоплёнок, ферментативное влияние фагов на бактериальные микроколони, этапы уничтожения фагами биоплёнок. Неспособность фага на практике полностью удалить из биоплёнки бактерий-хозяев либо из-за недоступности, либо из-за возникновения стойких штаммов, указывает на недостаточную эффективность или изученность этого метода. Однако добавление фагов к биоплёнкам, где уже имеют место антагонистические взаимодействия из-за выработки бактериоцина, может создать дополнительную нагрузку и запустить процесс разрушения биоплёнки. Предполагается, что некоторые фаги вообще могут лучше приспособиваться к росту в биоплёнках или в смешанных культурах. Это тоже область, требующая изучения параллельно с воздействием фагов на биоплёнки. Имеется множество вопросов, которые сегодня остаются без ответов. Тем не менее, подобные исследования должны послужить рациональной отправной точкой к дальнейшему пониманию фундаментальных и прикладных аспектов взаимодействия фага с биоплёнкой, а также к разработке более эффективных методов для уничтожения биоплёнок различного происхождения посредством фагов в биотехнологических процессах, медицине, водопотреблении, строительстве и других областях.

### **Литература**

1. Дрюккер В. В. Фаги озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // Тез. Междунар. Байк. микробиол. симп. – Иркутск : Изд-во Ин-та географии СО РАН, 2003. – С. 35.
2. Дрюккер В. В. Изучение морфологического разнообразия бактериофагов озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // Докл. Акад. наук. – 2006. – Т. 410. – С. 847–849.
3. Дрюккер В. В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // Докл. Акад. наук. – 2009. – Т. 427. – С. 277–281.
4. Abedon S. T. Ecology of viruses infecting bacteria / S. T. Abedon // Encyclopedia of Virology / eds.

- B. W. J. Mahy, M. H. V. Van Regenmortel. – 3rd ed. – Oxford : Elsevier, 2008. – P. 71–77.
5. Abedon S. T. Phage evolution and ecology / S. T. Abedon // *J. Adv. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 67. – P. 1–45.
6. Abedon S. T. Bacteriophages and biofilms / S. T. Abedon // *Biofilms: Formation, Development and Properties* / ed. W. C. Bailey. – 2011. – Chapter 1. – P. 1–58.
7. Abedon S. T. Bacteriophage Ecology / S. T. Abedon, S. Duffy, P. E. Turner // *Encyclopedia of Microbiology* / ed. M. Schaecter. – Oxford : Elsevier, 2009. – P. 42–57.
8. Abedon S. T. Why bacteriophage encode exotoxins and other virulence factors / S. T. Abedon, J. T. LeJeune // *J. Evol. Bioinform. Online.* – 2005. – Vol. 1. – P. 97–110.
9. Abedon S. T. Phage therapy pharmacology / S. T. Abedon, C. Thomas-Abedon // *J. Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 28–47.
10. Adams M. D. Bacteriophages / M. D. Adams. – N. Y. : Interscience Publishers, Inc., 1959.
11. Analysis of biofilm structure and gene expression using fluorescence dual labeling / E. S. Gilbert [et al.] // *J. Biotechnol. Adv.* – 2001. – Vol. 17. – P. 1180–1182.
12. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy / S. R. Wood [et al.] // *J. Dent. Res.* – 2000. – Vol. 79. – P. 21–27.
13. Azeredo J. The use of phages for the removal of infectious biofilms / J. Azeredo, I. W. Sutherland // *J. Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 261–266.
14. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli* / H. Hadas [et al.] // *J. Microbiology UK.* – 1997. – Vol. 143. – P. 179–185.
15. Biziulevicius G. A. A list of enzyme preparations covered by the term enzybiotics should not be restricted to bacteriophage-encoded peptidoglycan hydrolases (lysins) / G. A. Biziulevicius, G. Biziuleviciene, J. Kazlauskaitė // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 60. – P. 531–532.
16. Broudy T. B. The in vitro interaction of *Streptococcus pyogenes* with human pharyngeal cells induces a phage-encoded extracellular DNase / T. B. Broudy, V. Pancholi, V. A. Fischetti // *J. Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 2805–2811.
17. Collective decision making in bacterial viruses / J. S. Weitz [et al.] // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 95. – P. 2673–2680.
18. Cooper T. G. *The Tools of Biochemistry* / T. G. Cooper. – N. Y. : John Wiley, Sons, 1977.
19. Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis* / H. Deveau, M. R. Van Calsteren, S. Moineau // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 4364–4369.
20. Enzybiotics: a look at the future, recalling the past / P. Veiga-Crespo [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2007. – Vol. 96. – P. 1917–1924.
21. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation / C. B. Whitchurch [et al.] // *J. Science.* – 2002. – Vol. 295. – P. 1487.
22. Fischetti V. A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials / V. A. Fischetti // *J. Curr. Opin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 11. – P. 393–400.
23. Flood J. A. Virus-sized particles can be entrapped and concentrated one hundred fold within wetland biofilms / J. A. Flood, N. J. Ashbolt // *J. Adv. Environ. Res.* – 2000. – Vol. 3. – P. 403–411.
24. Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms / R. Briandet [et al.] // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74. – P. 2135–2143.
25. Friedman D. I. Lytic mode of lambda development / D. I. Friedman, M. Gottesman // *Lambda II. Cold Spring Harbor* / eds. R. W. Hedrix [et al.]. – N. Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983. – P. 21–51.
26. Green fluorescent protein as a novel species-specific marker in enteric dual-species biofilms / L. C. Skillman [et al.] // *J. Microbiology UK.* – 1998. – Vol. 144. – P. 2095–2101.
27. Hermoso J. A. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics / J. A. Hermoso, J. L. Garcia, P. Garcia // *J. Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 10. – P. 461–472.
28. High abundance of viruses found in aquatic environments / O. Bergh, K. Borsheim, G. Bratbak, M. Heldal // *J. Nature.* – 1989. – Vol. 340. – P. 467–468.
29. Hyman P. Phage ecology of bacterial pathogenesis / P. Hyman, S. T. Abedon // *SBacteriophage Ecology* / ed. T. Abedon. – Cambridge, UK : Cambridge University Press, 2008. – P. 353–385.
30. Hyman P. Bacteriophage host range and bacterial resistance / P. Hyman, S. T. Abedon // *J. Adv. Appl. Microbiol.* – 2010. – Vol. 70. – P. 217–248.
31. Koval S. F. Bacterial capsules – no barrier against *Bdellovibrio* / S. F. Koval, M. E. Bayer // *J. Microbiology UK.* – 1997. – Vol. 143. – P. 749–753.
32. Levin B. R. Coevolution in bacteria and their viruses and plasmids / B. R. Levin, R. E. Lenski // *Coevolution. Sunderland* / eds. D. J. Futuyama, M. Slatkin. – Massachusetts : Sinauer Associates, Inc. – 1983. – P. 99–127.
33. Lindberg A. A. Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption / A. A. Lindberg // *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell* / ed. I. W. Sutherland. – London : Academic Press, 1997. – P. 289–356.
34. Microbial biofilms / J. W. Costerton [et al.] // *J. Annu. Rev. Microbiol.* – 1995. – Vol. 49. – P. 711–745.
35. Neu T. R. Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems / T. R. Neu, G. W. D. Swerhone, J. R. Lawrence // *J. Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – P. 299–313.
36. O’Flaherty S. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria / S. O’Flaherty, R. P. Ross, A. Coffey // *J. FEMS Microbiol. Rev.* – 2009. – Vol. 33. – P. 801–819.
37. Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? / S. Skrabber [et al.] // *J. Biofilms.* – 2005. – Vol. 2. – P. 105–117.
38. Phenotype characterization of genetically defined microorganisms and growth of bacteriophage in



biofilms / R. J. McLean [et al.] // J. Meth. Enzymol. – 2001. – Vol. 336. – P. 163–174.

39. Reichert P. Movement of solids in biofilms-significance of liquid phase transport / P. Reichert, O. Wanner // J. Water Sci. Technol. – 1997. – Vol. 36. – P. 321–328.

40. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached consortium / A. T. Nielsen [et al.] // J. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 2. – P. 59–68.

41. Sass P. Lytic activity of recombinant bacteriophage  $\phi 11$  and  $\phi 12$  endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* / P. Sass, G. Bierbaum // J. Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73. – P. 347–352.

42. Scholl D. Polysaccharide-degrading phages / D. School, C. Merril // Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology / eds. M. K. Waldor, D. I. Friedman, S. L. Adhy. – Washington DC : ASM Press, 2005. – P. 400–414.

43. Solids retention time in heterotrophic and nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor / W. A. J. Van Benthum [et al.] // J. Water Sci. Technol. – 1995. – Vol. 32. – P. 35–43.

44. Stent G. S. Molecular Biology of Bacterial Viruses / G. S. Stent. – San Francisco, CA : WH Freeman and Co., 1963.

45. Sutherland I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment / I. W. Sutherland // J. Trends Microbiol. – 2001. – Vol. 9. – P. 222–227.

46. Sutherland I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework / I. W. Sutherland // J. Microbiology UK. – 2001. – Vol. 147. – P. 3–9.

47. The interaction of phage and biofilms / I. W. Sutherland [et al.] // J. FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 232. – P. 1–16.

48. Tolker-Nielsen T. Spatial organization of microbial biofilm communities / T. Tolker-Nielsen, S. Molin // J. Microb. Ecol. – 2000. – Vol. 40. – P. 75–84.

49. Van Voorthuizen E. M. Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes / E. M. Van Voorthuizen, N. J. Ashbolt, A. I. Schafer // J. Membr. Sci. – 2001. – Vol. 194. – P. 69–79.

50. Weinbauer M. G. Ecology of prokaryotic viruses / M. G. Weinbauer // J. FEMS Microbiol. Rev. – 2004. – Vol. 28. – P. 127–181.

51. Wommack K. E. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems / K. E. Wommack, R. R. Colwell // J. Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – N 64. – P. 69–114.

52. Yin J. Replication of viruses in a growing plaque: a reaction-diffusion model / J. Yin, J. S. McCaskill // Biophys. J. – 1992. – Vol. 61. – P. 1540–1549.

53. Zhang X. Q. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers / X. Q. Zhang, P. L. Bishop, M. J. Kupferle // J. Water Sci. Technol. – 1998. – Vol. 37. – P. 345–348.

54. Zhang X. S. *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colonic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA) / X. S. Zhang, R. Garcia-Contreras, T. K. Wood // ISME J. – 2008. – Vol. 2. – P. 615–631.

## Bacteriophages and their functioning in the biofilms

V. V. Drucker, A. S. Gorshkova

Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

**Abstract.** Nowadays, studies of bacteriophages (bacterial viruses), as well as of natural and artificial biofilms forming everywhere at different substrates, in organisms of humans and animals are very important, but poorly investigated fields in biology. The article presents a modern literature review concerning interaction of bacteriophages with biofilms of different origin.

**Key words:** classification of bacteriophages, biofilms structure, penetration and functioning of phages in biofilms, phages vs. biofilms, methods for biofilms studies.

*Дрюккер Валентин Валерьянович*  
Лимнологический институт СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
тел. (3952)42–54–15  
E-mail: drucker@lin.irk.ru

*Горшкова Анна Сергеевна*  
Лимнологический институт СО РАН  
664033, г. Иркутск, Улан-Баторская, 3  
кандидат биологических наук, научный сотрудник  
тел.: (3952)42–54–15  
E-mail: kovadlo@lin.irk.ru

*Drucker Valentin Valeryanovich*  
Limnological Institute RAS  
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033  
D. Sc. in Biology, Prof.,  
principal research scientist  
phone: (3952)42–54–15  
E-mail: drucker@lin.irk.ru

*Gorshkova Anna Sergeevna*  
Limnological Institute SB RAS  
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033  
Ph. D. in Biology, research scientist  
phone: (3952)42–54–15  
E-mail: kovadlo@lin.irk.ru