

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)**

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования "Российский университет дружбы народов имени
Патриса Лумумбы" (ФГАОУ ВО РУДН)**

На правах рукописи

Абдулкадиева Марьям Махдиевна

**АНАЛИЗ И ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАТТЕРНОВ
ПРИ ПОВЕРХНОСТНОГО ДВИЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ В
МИКРОФЛЮИДИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук.

Научный руководитель: к.б.н. Сысолятина Е.В.

Научный консультант д.х.н. Станишевский Я.М.

Москва 2024

Оглавление

Введение.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Подвижность бактерий. Роль подвижности в экологии микроорганизмов и патогенезе воспалительных заболеваний.....	14
1.1.1. Роль подвижности в патогенезе воспалительных (инфекционных) заболеваний, вызванных бактериями <i>Escherichia coli</i>	16
1.1.2. Роль подвижности в патогенезе воспалительных (инфекционных) заболеваний, вызванных бактериями <i>Listeria monocytogenes</i>	19
1.2. Особенности движения бактерий в приповерхностном слое. Связь траекторий движений с адгезией.....	20
1.3. Механизмы движения. Строение жгутиков. Регуляция подвижности (хемотаксис, фототаксис).....	22
1.3.1. Хемотаксис.....	30
1.4. Оценка и анализ подвижности бактерий.....	32
1.4.1. Ориентация клеток при движении у твердой поверхности.....	35
1.4.2. Паттерны движения на открытых пространствах.....	36
1.4.3. Паттерны движения в каналах разной ширины.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
2.1. Материалы.....	42
2.2. Микробиологические методы.....	42
2.2.1. Виды бактерий и условия культивирования.....	42
2.2.2. Оценка подвижности бактерий в полужидком агаре.....	42
2.2.3. Конструкция микрофлюидической камеры.....	43
2.2.4. Оценка подвижности в средах с различной вязкостью и концентрации.....	43
2.2.5. Оценка паттернов подвижности бактерий.....	44
2.2.6. Адгезия микроорганизмов к пластику.....	44
2.2.7. Адгезия <i>E. coli</i> ATCC43890 в клетки HEp-2.....	45
2.2.8. Адгезия подвижных и неподвижных листерий к клеткам HEp-2....	45
2.2.9. Инвазия <i>L. monocytogenes</i> в клетки HEp-2.....	47
2.2.10. Иммуноферментный анализ.....	47
2.2.11. Визуализация бактериальных и эукариотических клеток.....	48
2.2.12. Визуализация бактерий с использованием сканирующей электронной микроскопии.....	49
2.2.13. Оценка антибиотикочувствительности.....	49

2.2.14. Статистические методы.....	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
3.1. Разработка и валидация прототипа системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий.....	51
3.2. Анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов <i>E. coli</i>	59
3.3. Установление характеристик подвижности штаммов <i>E. coli</i> как активной среды, частицы которой имеют направленное движение.....	62
3.4. Характеристика эффективности адгезии к пластику подвижных и неподвижных штаммов <i>E. coli</i>	64
3.5. Оценка влияния подвижности <i>E. coli</i> на эффективность адгезии к клеткам человека линии HEp-2.....	65
3.6. Анализ рисунков адгезии патогенных и сапрофитических штаммов....	67
3.7. Анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов <i>Listeria spp</i>	69
3.8 Анализ профилей скоростей <i>L. monocytogenes</i> и <i>L. innocua</i> на стадии приповерхностного движения.....	72
3.9. Оценка эффективности адгезии подвижных <i>Listeria spp</i>	75
3.10. Распределение подвижных и неподвижных бактерий <i>Listeria spp</i> на поверхности клеток HEp-2.....	77
3.11. Оценка инвазии подвижных и неподвижных <i>L. monocytogenes</i>	80
3.12. Применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности <i>L. monocytogenes</i>	82
3.13. Применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности на примере чувствительных и устойчивых к гентамицину штаммов <i>P. aeruginosa</i>	84
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
ВЫВОДЫ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102

Введение

Актуальность темы и степень ее разработанности

Подвижность микроорганизмов является их важной видовой характеристикой. Наличие органелл передвижения (флагелл) позволяет свободноживущим бактериям эффективно расселяться, а патогенным реализовывать вирулентность, то есть адгезироваться на поверхности, колонизировать ее, а в случае с внутриклеточными паразитами, например, листериями, проникать в клетку-хозяина [20, 97, 142, 146].

Такие исследователи, как Berg с коллегами, посвятившие десятки лет изучению характера движения бактерий и механизмов, лежащих в его основе, подготовили почву для бурного развития новой отрасли науки, стоящей на стыке микробиологии, физики и математического моделирования, биофизике коллективного поведения микроорганизмов [24, 27, 201]. Подвижные бактерии с физической точки зрения представляют собой активные броуновские частицы, способные преобразовывать энергию, получаемую извне, в собственную кинетическую энергию движения [19, 172]. Исходя из этого, суспензии подвижных бактерий являются частным случаем активных сред, которые могут быть охарактеризованы только методами неравновесной физики [19]. В последние годы опубликовано большое количество работ, описывающих, в том числе математически, особенности перемещения подвижных микроорганизмов в зависимости от условий, в которых они находятся [111, 123, 135, 181]. Основными объектами для изучения подвижности стали *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes*.

Большинство исследователей использовали *E. coli* как наиболее хорошо охарактеризованный подвижный вид, простой в культивировании и включающий широкий спектр штаммов от безопасных лабораторных до патогенных [111, 123, 135, 181]. Известно, что микроорганизмы используют механосенсинг для обнаружения своего местонахождения. В основе работы

бактериального механосенсора лежит вращающийся жгутик, который способен детектировать незначительные физические изменения в функционировании своего мотора при взаимодействии с поверхностью [20]. Было установлено, что в зависимости от удаленности от твердой поверхности в суспензии кишечной палочки дикого типа наблюдается изменение траекторий движения [135]. Так, в вышеуказанной работе приводятся данные, что на расстоянии 20-120 мкм от поверхности 70% бактерий перемещалось по типичным траекториям пробег-кувырок (run and tumble) и 30% характеризовались медленным хаотичным перемещением (slow random walk) [135]. Однако клетки, находящиеся ближе к стеклу (в пределах 20 мкм), реже вращались («кувыркались»), углы их реориентации были в среднем на 34% меньше, чем для бактерий, располагающихся в толще бактериальной суспензии, что приводило к тому, что направление их движения оставалось параллельным поверхности [135]. Другим типичным движением в приповерхностном слое для *E. coli* являются длинные круговые траектории (long circular trajectories), модели движения которых описаны в ряде работ [111, 123, 181]. Для объяснения значения «непродуктивного» кругового движения Irina et al. создали математическую модель движения энтерогемморрагического штамма *E. coli* ЕНЕС [152]. Авторы пришли к выводу, что в основе таких круговых траекторий лежат кратковременные остановки и прикрепление бактерий в различных точках траектории, что может быть важным для эффективной колонизации и, следовательно, выживания в окружающей среде и организме хозяина.

Предполагается, что микроорганизмы, имеющие одинаковые размерные и структурные характеристики, например, являющиеся грамтрицательными перитрихами, как кишечная палочка, должны иметь сходные модели перемещения. Однако штаммы кишечной палочки морфологически и физиологически сильно различаются между собой. Например, лабораторный штамм *E. coli* JM109 является слабоподвижным, а его родительский штамм K-12 не имеет фимбрий, необходимых для колонизации поверхности кишечника

человека [120]. Успешно заселяющий кишечник патогенный штамм кишечной палочки EHEC O157:H7 для адгезии использует длинные полярные фимбрии (LPF -Long Polar Fimbria), более короткие образования, чем жгутики [70, 195, 213]. Полногеномным секвенированием было установлено 14 локусов LPF, из них 10 консервативные, а 4 присущи только штамму *E. coli* O157:H7, два из которых напоминают LPF сальмонелл. Было установлено, что экспрессия *lpf1* оперона STEC O157:H7 в штамме *E. coli*, лишенном фимбрий, приводило к увеличению его адгезии к HeLa and MDCK клеткам [194]. Тем не менее несмотря на то, что EHEC O157 прекрасно колонизирует кишечник, он хуже, чем дикие типы образует биопленки [197].

Таким образом, патогенные и непатогенные штаммы кишечной палочки значительно отличаются по подвижности и способности к адгезии, что позволяет предположить, что модели, которые описывают движение бактерий в зависимости от их формы и наличия жгутиков на примере непатогенных микроорганизмов, могут не являться адекватными и прогностическими для бактерий, являющихся факультативными паразитами. Для этих микроорганизмов может быть важным изменение в характере движения в зависимости от условий, в которых они находятся: во внешней среде или в организме хозяина. Ярким примером различного поведения микроорганизмов в зависимости от условий окружающей среды являются внутриклеточные паразиты листерии. При температуре окружающей среды до 30°C они, являясь перетрихами, как и кишечная палочка, перемещаются при помощи флагелл, но при повышении температуры до 37°C прекращают синтез флагеллина, лишаются жгутиков, и для внутриклеточного перемещения полимеризуют актин клетки-хозяина [190].

Потеря листериями подвижности в организме хозяина не является критичной для реализации патогенности. Благодаря белкам интерналинам они индуцируют свою инвазию в клетки-мишени. Для внеклеточных паразитов, например, таких, как *E. coli* EHEC, для адгезии к эукариотическим клеткам необходимо более специфическое взаимодействие с рецепторами, которое

должно быть тем более эффективным, чем подвижнее микроорганизм. Вероятно, поведение подвижных патогенных и непатогенных близкородственных микроорганизмов вблизи поверхности может различаться в зависимости от параметров среды, приводя к различной эффективности адгезии к клеткам-мишеням и абиотическим поверхностям. В связи с этим установление роли траекторий движения патогенных и свободноживущих бактерий в адгезии и колонизации биотических и абиотических поверхностей является фундаментальной, а задача сравнения траекторий движения близкородственных пар патоген/непатоген в зависимости от удаленности от поверхности и изменения параметров среды, математический анализ траекторий и связь особенностей движения с эффективностью адгезии и колонизации, по нашим данным, ставится впервые.

В связи с этим была сформулирована следующая **цель работы**:

Выявление закономерностей в характере приповерхностного движения бактерий в условиях их взаимодействия с абиотическими поверхностями и эукариотическими клетками.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разработать систему анализа паттернов приповерхностного движения бактерий для оценки их жизнеспособности и характера адаптации к условиям окружающей среды;
2. Валидировать разработанную систему на подвижных микроорганизмах *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes* при разных параметрах окружающей среды (вязкости, концентрации бактерий);
3. Оценить связь паттернов приповерхностного движения с адаптацией *Escherichia coli* к колонизации биотической поверхности на примере энтеропатогенного штамма *E. coli* ATCC34890 и пробиотического штамма *E. coli* M17

4. Установить связь паттернов приповерхностного движения с эффективностью адгезии и инвазии патогенных и непатогенных для человека видов листерий на примере *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*;

5. Оценить возможность практического применения системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий для прогнозирования уровня антибиотикоустойчивости и других характеристик подвижных патогенных микроорганизмов (вирулентности, биобезопасности).

Научная новизна.

Впервые на примере штаммов кишечной палочки показано, что направленное коллективное движение сапрофитического штамма *E. coli* M17 в приповерхностном слое коррелировало с увеличением уровня адгезии и формированием скоплений бактерий в межклеточном пространстве, что повышало эффективность колонизации биотической поверхности. Для энтерогеморрагического штамма *E. coli* ATCC43890 было показано движение преимущественно в вертикальной плоскости и короткое время нахождения в слое, что могло приводить к более эффективному поиску рецепторов для взаимодействия с эукариотической клеткой и реализации патогенных свойств. Установлено, что все виды используемых в работе листерий (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) имели сходные паттерны приповерхностного движения и высокие средние скорости (17-27 мкм/с)/ Подвижность также коррелировала с образованием скоплений бактерий в области межклеточных контактов, что для патогенного для человека и животных вида *L. monocytogenes* означает локализацию в зоне повышенной концентрации необходимых для инвазии рецепторов E-кадгерина и C-Met. Это приводило к повышению эффективности инвазии в 8 раз. Получены данные о возможности использования разработанной системы анализа паттернов приповерхностного движения для прогнозирования антибиотикорезистентности.

Практическая значимость

Разработана система анализа движения бактерий, позволяющая получать данные о средней и медианной скорости перемещения

микроорганизмов, среднем времени нахождения в слое, траекториях движения, наличии коллективного/направленного движения. Установлено, что данный подход может применяться как для получения фундаментальных данных о вкладе подвижности в адгезию и инвазию микроорганизмов, в том числе патогенных для человека, так и для экспресс-диагностики чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Фундаментальные сведения о вкладе паттернов подвижности в адгезию и инвазию бактерий используются в курсе лекций для аспирантов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Методологией исследования является создание системы, позволяющей анализировать паттерны подвижности микроорганизмов и использование её для поиска связи между особенностями движения близкородственных патогенных и непатогенных бактерий и их способностью к адгезии и инвазии. В работе использовались математические, бактериологические, культуральные, микроскопические, иммуноферментные методы. Данные обрабатывали с помощью компьютерного и статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Создана и валидирована система анализа паттернов приповерхностного движения микроорганизмов в микрофлюидических системах, позволяющая оценить средние скорости, время нахождения в слое, воссоздать траектории движения, наличие коллективного/направленного движения.

2. Выявлены различия в паттернах подвижности штаммов *E. coli*: энтерогеморрагического штамма O157:H7 и пробиотического штамма M17, обеспечивающие различия в паттернах колонизации поверхности эпителиальных клеток Hep-2

3. Подвижные листерии четырех видов имели сходные паттерны приповерхностного движения и рисунок адгезии, характеризующийся скоплением бактерий в местах межклеточных контактов, что для патогенного для человека и животных вида *L. monocytogenes* приводило к повышению эффективности инвазии в 8 раз.

4. Разработанная система позволяла детектировать изменения в характеристиках подвижности чувствительных к гентамицину *L. monocytogenes* и *P. aeruginosa* уже после 30 и 90 минут инкубации в среде с антибиотиком, соответственно, что закладывает основы дальнейшей разработки экспресс-диагностики антибиотикочувствительности подвижных микроорганизмов на основе системы анализа паттернов приповерхностного движения.

Личный вклад автора

Разделы: характеристика эффективности адгезии к пластику подвижные и неподвижные штаммов *E. coli*; оценка влияния подвижности *E. coli* на эффективность адгезии к клеткам человека линии HEp-2; оценка эффективности адгезии подвижных *Listeria spp*; оценка инвазии подвижных и неподвижных *L. monocytogenes*; применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности *L. monocytogenes* были выполнены автором лично.

Разделы: разработка и валидация прототипа системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий; анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*; установление характеристик подвижности штаммов *E. coli* как активной среды; анализ рисунков адгезии патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*; анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *Listeria spp.*; анализ профилей скоростей *L. monocytogenes* и *L. innocua* на стадии приповерхностного движения совместно с с.н.с. лаб.

экологии возбудителей инфекций к.ф-м.н. Васильевой Е.В. и сотрудниками ОИВТ РАН д.ф-м.н. Васильевым М.М. и акад.РАН Петровым О.Ф.

Распределение подвижных и неподвижных бактерий *Listeria spp.* на поверхности клеток HEp-2 с помощью электронной микроскопии было установлено совместно с научными сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России к.м.н. Жуховицким В.Г., к.м.н. Шевлягиной Н.В., к.м.н. Андреевской С.Г.

На базе ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» были осуществлены все эксперименты, связанные с работой с патогенными микроорганизмами III-IV групп патогенности и проведен анализ паттернов подвижности. На базе ФГАОУ ВО РУДН проводился подбор условий для 3D печати микрофлюидических камер, валидация системы анализа паттернов подвижности в средах с разной вязкостью, микроскопия фиксированных препаратов.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в медико-биологических исследованиях 5%-ом уровне значимости (0,05)

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: Ломоносов-2020, Российский микробиологический конгресс 2021, FEMS Conference on Microbiology 2022, Ломоносов-2023, XXV Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии - 2023, X Международная конференция молодых ученых: бионформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов - 2023,

Материалы II Российского конгресса по медицинской микробиологии и инфектологии- 2024.

В завершеном виде работа была апробирована и рекомендована к защите на совместной научной конференции отделов Медицинской микробиологии и Природноочаговых инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации «19» июля 2024 года.

30 июня 2022 года было проведено заседание государственной экзаменационной комиссии по рассмотрению научно-квалификационной работы по направлению: 06.06.01. Биологические науки. 03.01.06 Биотехнология (в т.ч. биотехнология). В Российском университете дружбы народов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.11 Микробиология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 5 и 12 паспорта специальности «Микробиология».

Публикации

Основные положения диссертации изложены автором в 9 печатных работах, из них 1 статья в журнале базы данных РИНЦ, 2 статьи в рецензируемых журналах Scopus/WoS и рекомендованных ВАК для публикации к защите, все - по результатам экспериментальных исследований, 6 тезисов в сборнике трудов конференции, из них 1 в международном.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (214 источников, из которых отечественных

публикаций – 1, иностранных публикаций – 213). Работа содержит 5 таблиц и 32 рисунка.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Подвижность бактерий. Роль подвижности в экологии микроорганизмов и патогенезе инфекционных заболеваний.

Подвижность является огромным преимуществом для бактериальных патогенов, поскольку обеспечивает активный поиск и колонизацию клеток-мишеней, а в случае с внутриклеточными паразитами – инвазию [47, 62, 97]. Подвижность вносит вклад в вирулентность многих видов патогенных бактерий, включая возбудителей инфекций желудочно-кишечного тракта, например, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* и *Listeria monocytogenes* [16, 82, 95, 142, 161]. Так, для *H. pylori* подвижность является определяющим фактором, позволяющим персистировать в организме хозяина: неподвижные и не способные к хемотаксису бактерии быстро элиминируются из макроорганизма [82, 97]. Другие возбудители кишечных инфекций, такие как *L. monocytogenes* и энтеропатогенные виды *Yersinia*, обладают подвижностью при обитании в окружающей среде, но теряют жгутики при адаптации к условиям жизни внутри теплокровного хозяина [142, 209]. Однако даже для *L. monocytogenes* и патогенных *Yersinia spp.*, которые теряют жгутики на поздних стадиях инфекции, хемотаксис и подвижность жгутиков необходимы для ранней колонизации желудочно-кишечного тракта [131, 142].

Выделяют несколько различных типов движения микроорганизмов, включая плавание (swimming), роение (swarming), скольжение и подтягивание [94]. Плавание и роение осуществляются за счет вращения пучка жгутиков, в то время как для других способов движения микроорганизмы используют другие поверхностные структуры и механизмы, например, пили IV типа [103, 184]. Плавание представляет собой движение бактерий в жидкой среде в рамках следующих схем: пробег-кувырок, пробег-возврат, что связано с количеством и расположением жгутиков [9, 186]. Для кишечной палочки, перитриха, имеющего 4-8 жгутиков, типичной схемой движения является пробег-кувырок, для монотрихов маятникообразные движения (пробег-

возврат) [7]. Характерной особенностью плавающих бактерий является выход из толщи жидкости под большим углом и уменьшение скорости движения и угла наклона бактериальной клетки до 10 градусов по мере приближения к поверхности. Жгутики плавающих бактерий при этом отклоняются в сторону от поверхности [198].

Роевание представляет собой взаимодействие бактерий друг с другом в тонкой пленке жидкости, находящейся над влажной поверхностью, например, агаром [23, 24, 184]. Клетки роящихся бактерий располагаются почти параллельно поверхности со средним углом наклона 0,7 градуса [9, 55, 67, 98, 186].

При сравнении вирулентности подвижных и неподвижных штаммов со жгутиками было убедительно продемонстрировано, что для некоторых видов бактерий для успешного заражения необходима подвижность. Например, при заражении мышей смесью подвижных и неподвижных штаммов *Campylobacter jejuni* из организма инфицированного животного выделяли только подвижные бактерии [139]. Кроме того, было установлено, что при пероральном инфицировании животных смесью подвижных и неподвижных листерий в соотношении 1:1 подвижные бактерии вытесняли неподвижные при колонизации кишечника на ранних этапах заражения. При этом уровень инфицирования печени также зависел от подвижности *L. monocytogenes* [142].

Наиболее важную роль подвижность приобретает в процессе взаимодействия возбудителя с поверхностью (клетки, медицинских изделий) [133, 184]. Этот этап является решающим для адгезии и последующей колонизации биотических и абиотических поверхностей. Взаимодействие подвижного микроорганизма с любым объектом можно разделить на несколько этапов: (I) приземление (landing, «лэндинг»), т.е. выход бактерии из объема жидкости, характеризующийся изменением частоты и направленности вращения жгутиков по сравнению с поведением бактерий в объеме; (II) приповерхностное движение/плавание (NSS – near surface swimming) - серия кратковременных взаимодействий с поверхностью, может приводить

впоследствии к адгезии; (III) остановка, характеризующаяся длительным взаимодействием бактерии с поверхностью; (IV) адгезия/открепление, т.е. прикрепление к поверхности, или, альтернативно, открепление и возвращение в объем жидкости [11, 32, 49].

1.1.1. Роль подвижности в патогенезе инфекционных заболеваний, вызванных бактериями *Escherichia coli*

Колонизация организма хозяина комменсальными, пробиотическими или патогенными штаммами кишечной палочки – важнейший шаг в развитии инфекционного процесса и образования биопленок. Важнейшую роль в этом играют флагеллы и фимбрии/пили [105].

Желудочно-кишечный тракт человека представляет собой естественную нишу для *E. coli* [164]. Штаммы-комменсалы участвуют в метаболизме пищи и обеспечивают защиту от инвазии патогенных видов. Вместе с тем, патогенные кишечные палочки являются наиболее частой причиной кишечных или внекишечных заболеваний человека [93]. Идентифицировано несколько патоваров патогенной кишечной палочки, общих для человека и животных. Все они являются объектом пристального внимания врачей и пищевых микробиологов [35, 78].

Каждый из 8 патоваров *E. coli* (энтропатогенный, энтеротоксигенный, энтерогеморрагический, энтероаггегативный, энтероинвазивный, диффузно адгезирующий и вызывающий неонатальные менингиты) вызывает гастроэнтериты и внекишечные инфекции, что связано с использованием бактериями специфического механизма колонизации определенных участков человеческого тела [54]. Большинство патоваров прикрепляется к поверхности клетки хозяина с помощью фимбрий и кюрлей [46]. После адгезии они начинают колонизацию и вызывают симптомы заболевания, производя компоненты матрикса биопленок и другие факторы патогенности [31].

Для взаимодействия с поверхностью энтероцитов бактериям необходимо вначале преодолеть защитный слой слизи, в состав которой

входят полисахариды и гликопротеины. Неподвижный при выращивании в среде DMEM зоонозный энтеропатоген энтерогеморрагическая *Escherichia coli* O157:H7 (ЕНЕС), попадая в кишечник, распознает бутират - сигнальную молекулу, производную короткоцепочечных жиров. Взаимодействие с бутиратом активирует вначале транскрипцию генов, ответственных за формирование и функционирование жгутиков, а затем генов, вовлеченных в адгезию и систему секреции III типа (Т3SS), что способствует активному преодолению слизистого барьера и колонизации [192].

При этом было показано, что образованные жгутики Н7 связываются со слизью желудочно-кишечного тракта, а более поздние работы продемонстрировали связывание различных жгутиков *E. coli*, включая Н7, с фосфо- и сульфолипидами мембраны эукариотических клеток [68, 162]. Таким образом, можно предположить, что подвижность необходима энтеропатогенной кишечной палочке как для того, чтобы преодолевать слизистый барьер, так и для адгезии и взаимодействия с мембраной клеток хозяина.

С подвижностью тесно связана способность бактерий образовывать биопленки. Первый этап биопленкообразования включает плавание и роение для поиска наиболее благоприятных условий для колонизации [124]. При достижении областей оптимума клетки кишечной палочки теряют флагеллы и формируют агрегаты, что сопровождается выработкой экзополисахаридов [57]. Таким образом, ингибция флагалярной подвижности является важнейшим шагом в агрегации клеток и последующем образовании биопленок. С другой стороны, подвижность необходима для достижения биотических или абиотических поверхностей [205]. Подвижность и биопленкообразование у кишечной палочки положительно коррелируют и регулируются сигнальными молекулами quorum sensing. Планктонные клетки обладают значительной подвижностью при высокой способности к образованию биопленок [10]. При этом разнообразие штаммов кишечной палочки настолько велико, особенно между сапрофитическими и

патогенными видами, что сделать общий вывод о роли подвижности в образовании биопленок, не представляется возможности. В частности, штаммы морфологически и физиологически сильно различаются. Например, лабораторный штамм *E. coli* JM109 имеет жгутики и хорошо образует биопленки, но плохо подвижен из-за делеции гена *recA*, необходимого для стандартного переключения вращения жгутиков [75, 120, 128, 155]. Штаммы *E. coli*, продуцирующие вирулентный токсин, принадлежащие к серотипу O157:H7, также имеют жгутики, подвижны и успешно колонизируют кишечник хозяина, но являются плохими продуцентами биопленок в экспериментальных условиях [70, 194, 195, 213].

Тем не менее, патогенез воспалительных (инфекционных) заболеваний, вызванных кишечной палочкой напрямую связан с формированием биопленок на поверхности клеток и продукцией факторов вирулентности [102]. Опосредованная флагаеллами подвижность и хемотаксис вносят вклад в вирулентность уропатогенной кишечной палочки, так как позволяют избежать воздействия иммунной системы хозяина и обеспечивают движение в направлении более благоприятных условий существования [47].

Сигнальный механизм, вовлеченный в флагаеллярную подвижность и образование биопленок, регулируется на уровне транскрипции и трансляции. Переход от подвижной к неподвижной стадиям жизненного цикла кишечной палочки считается наиболее важным событием в физиологии бактерий и патогенезе воспалительных заболеваний, вызванных бактериями, так как значительно увеличивает устойчивость бактерий к широкому кругу стрессовых факторов. Несколько сигнальных путей регулируют одновременно и подвижность, и формирование компонентов биопленок [149]. Поэтому ингибирование флагаеллярной подвижности может быть многообещающей стратегией по ограничению эффективности колонизации патогенных кишечных палочек.

1.1.2. Роль подвижности в патогенезе инфекционных заболеваний, вызванных бактериями *L. monocytogenes*

Род *Listeria* в настоящее время включает 28 видов, это убиквитарные мелкие палочковидные грамположительные бактерии, из которых только *Listeria ivanovii* и *L. monocytogenes* являются возбудителями листериоза млекопитающих [80, 143]. *L. innocua* наиболее генетически близка к виду *L. monocytogenes* [140], но в отличие от *L. monocytogenes*, *L. innocua* имеет жгутики и подвижна как при температуре окружающей среды, так и при температуре тела человека [96].

L. monocytogenes – возбудитель пищевой инфекции, обнаруженный в почве, растениях и животных [36]. Он является факультативным внутриклеточным паразитом, который попадает в организм с зараженной пищей, преодолевает кишечный барьер и колонизирует внутренние органы, включая печень, селезенку, мозг, плаценту и плод, используя способность проникать и размножаться в непрофессиональных фагоцитах [112]. Попав внутрь хозяина, *L. monocytogenes* использует разнообразные и сложные механизмы проникновения и выживания в различных типах эукариотических клеток, уклоняясь при этом от действия иммунной системы, что приводит к диссеминации микроорганизма [157]. Этот возбудитель может преодолевать гематоэнцефалический и плацентарный барьер, что приводит к менингитам, абортированию плодов и летальным исходам (до 30%) у лиц с ослабленным иммунитетом [48, 170].

Для инвазии в эпителиальные клетки и другие непрофессиональные фагоциты *L. monocytogenes* необходимы продукты локуса *inlAB*, поверхностные белки семейства Internalin InlA и InlB [53] Оперон *inlAB* входит в состав регулона вирулентности *L. monocytogenes*, и его экспрессия зависит от температуры окружающей среды. Так, он активируется при температуре тела человека (37°C) [115].

L. monocytogenes имеет от четырех до шести жгутиков, которые двигаются аналогично жгутикам *E. coli* и жгутикам других перитрихов [151]. Активность жгутиковых генов *L. monocytogenes* также зависит от температуры: бактерии подвижны при температуре ниже 30°C (оптимум для подвижности 20-25°C), а при 37°C жгутиковая подвижность утрачивается [151]. Таким образом, переход от температуры окружающей среды к физиологической температуре теплокровного хозяина активирует регулон вирулентности *L. monocytogenes* и снижает подвижность жгутиков [116]. Тем не менее, в ряде работ было показано, что не наличие жгутиков, а их подвижность важна для инвазии эпителиальных клеток *L. monocytogenes* при кишечной инфекции [33, 61, 142, 206]. Объяснение этому феномену до сих пор не найдено.

1.2. Особенности движения бактерий в приповерхностном слое. Связь траекторий движений с адгезией.

Перемещение подвижных бактерий в жидкости отличается от броуновского [22]. В растворе *E. coli* быстро плавают в произвольном направлении и случайным образом меняют направление за счет распада пучка жгутиков, что называется «кувырканием» [76, 150]. Вблизи поверхности изменяются гидродинамические свойства среды, и микроорганизм меняет характеристики движения, что приводит к пристеночному скоплению бактерий [29], круговому движению параллельно поверхности [111] и оседанию [135].

Было установлено, что физические границы играют большую роль при движении бактерий в приповерхностном слое и оказывают сильное влияние на динамику. Условия раздела фаз приводят к разным последствиям, одним из которых является появление круговых траекторий у бактерий, движущихся вблизи твердых поверхностей. Такое поведение наблюдалось и для кишечной палочки [28, 76].

При плавании бактерий на границе раздела фаз сила сопротивления становится несимметричной для контактирующей с твердой поверхностью частью бактерии и обращенной к водной среде. При движении в водной среде движение жгутиков сбалансировано вращением тела бактерии в противоположную сторону (у кишечной палочки тело клетки вращается по часовой стрелке, а жгутики против). Вызванное столкновением с поверхностью сопротивление приводит к вращению клетки, в результате чего бактерии описывают круговые траектории по часовой стрелке [111](рис. 1).

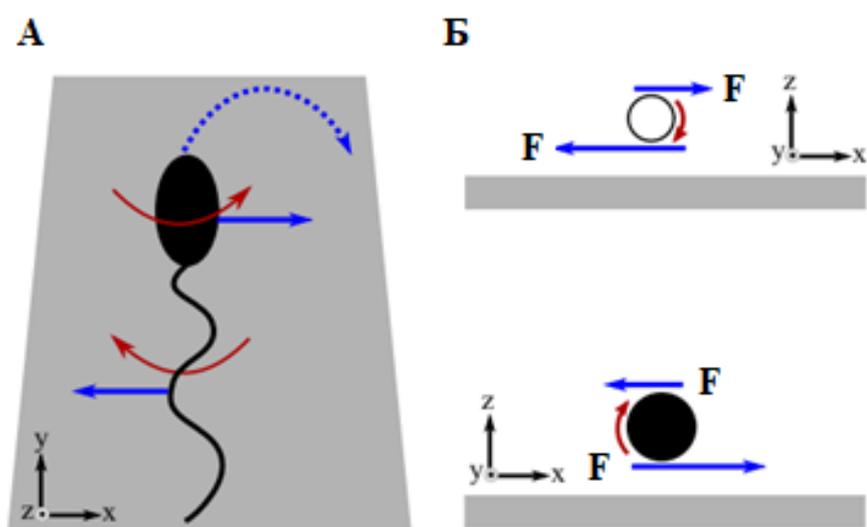


Рисунок 1. Круговое плавание бактерии вблизи поверхности. (А) Гидродинамические эффекты, влияющие на бактерию у границы поверхности, вызывают круговое движение бактерии (пунктирная синяя стрелка). Тело бактерии и жгутик вращаются в противоположных направлениях (красные стрелки). На жгутик действует сила слева от них, а на тело бактерии – справа (синие стрелки). (Б) Пространственное распределение сил сопротивления на теле бактерии и жгутике [7].

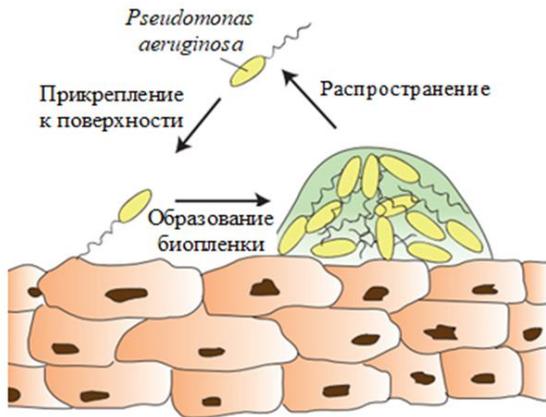
1.3. Механизмы движения. Строение жгутиков. Регуляция подвижности (хемотаксис, фототаксис).

Бактерии имеют множество макромолекулярных механизмов, которые обеспечивают метаболические процессы, поддерживают целостность и

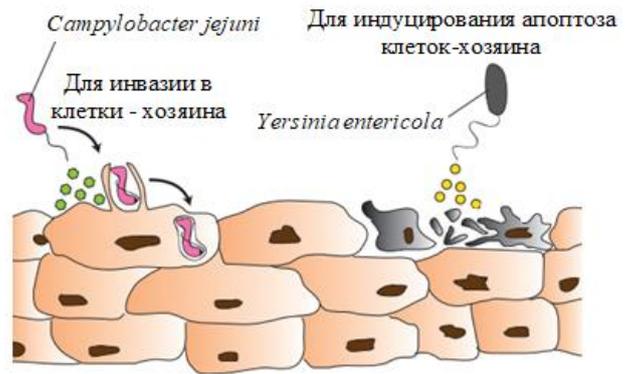
регулируют деление клетки, и лишь немногие из них столь сложно устроены, как бактериальный жгутик [166]. Состоящая примерно из 30 уникальных структурных белков, число копий которых варьирует от нескольких до десятков тысяч, полная жгутиковая структура может достигать 60 нм в поперечнике, 10 мкм в длину и весить около 1 млрд Да [118, 138, 166]. Жгутики являются жесткими подвижными органеллами, и вращение жгутиковых нитей обеспечивает бактериям движущую силу для хемотаксического перемещения через жидкости (плавание) и высоковязкие среды или поверхности (роение) [24, 50].

Для многих патогенных микроорганизмов жгутики также играют решающую роль в бактериальном патогенезе, способствуя взаимодействию бактерий с хозяевами и образованию биопленок (рис. 2). Термин "плавательная подвижность" используется для обозначения перемещения в жидкой среде с помощью жгутиков. Этот процесс был подробно изучен у перитриховых *E. coli* и *Salmonella enterica* серовар Typhimurium [50, 189].

а) Адгезия и образование биопленок



б) Секретия эфффекторов



в) Фагоцитоз

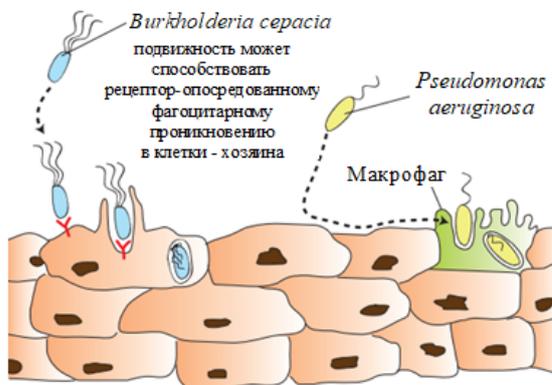


Рисунок 2. Роль жгутиков в колонизации и инвазии. Различные патогенные микроорганизмы вступают в разные типы взаимодействия со своими хозяевами в процессе патогенеза. (а) Некоторые организмы адгезируются на поверхности только для деления, оставаясь в планктонной форме, в то время как другие образуют биопленки. (б) Другие выделяют эффекторные молекулы для управления отдельными клетками хозяина. (в) Третьи прокладывают путь в глубоко лежащие ткани или обитают внутри клеток благодаря фагоцитозу [47].

Жгутик состоит из трех частей: базального тела (которое содержит реверсивный мотор, прикрепляющий структуру к мембране), крюка (который выходит из верхней части базального тела и действует как универсальный шарнир) и филамента (который имеет длину, превышающую длину

бактериальной клетки, в несколько раз и при вращении образует спиральный пропеллер) (Рис. 3).

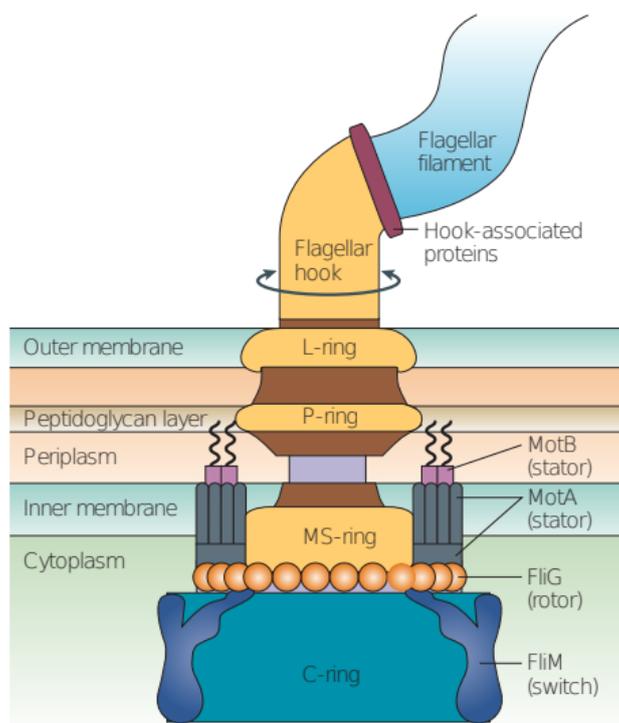


Рисунок. 3. Жгутик *E. coli* состоит из трех частей: базального тела, крюка и нити (филамента). Многие бактерии перемещаются в жидкостях с помощью филаментов, приводимых в движение вращающимся мотором. Ядром молекулярного мотора является базальное тело. Базальное тело пронизывает все три слоя клеточной оболочки: внешнюю мембрану, клеточную стенку из пептидогликанов и цитоплазматическую мембрану. Поток протонов, проходящий примерно через одиннадцать силовых элементов (комплексов MotAB), создает силу для вращения жгутиков [7].

Самосборка флагеллярной системы – это многоступенчатый иерархический процесс, который начинается с координированной сборки флагеллярной системы секреции III типа (T3SS) (гомологичной T3SS ядра иглоподобной структуры инъектисомы [1, 65], MS-кольца в

цитоплазматической мембране и С-кольца на ее цитоплазматической поверхности [114, 137]. MS- и С-кольца начинают формировать каркас для сборки цитоплазматических компонентов флагеллярного ТЗСС [3, 87]. Пептидогликановое Р-кольцо и липополисахаридное L-кольцо собираются в ассоциации с ТЗСС, формируя каналы, через которые осевые компоненты жгутика могут собираться и вращаться. Затем ТЗСС набирает, разворачивает и экспортирует белки через полое ядро растущей осевой структуры для сборки простирающегося в периплазму стержня, жгутикового крюка и жгутиковой нити на дистальном конце [130]. В то время как стержень и крюк имеют детерминированную длину, филамент достигает нескольких микронов в длину. В базальном теле жгутика находится мотор, обеспечивающий вращение за счет взаимодействия подвижной части – ротора, и неподвижной статора. Трансмембранный блок статора жгутикового мотора проводит ионы и оказывает усилие на ротор. По строению статорные единицы делятся на три группы: H^+ -связанный комплекс MotAB, Na^+ -связанный комплекс PomAB и Na^+ -связанный комплекс MotPS [107]. Комплекс MotAB состоит из четырех копий MotA и двух копий MotB и действует как трансмембранный H^+ канал [40, 108]. Комплексы PomAB и MotPS образуют Na^+ -канал, подобно комплексу MotAB [91, 168, 188].

Статорные комплексы, передают энергию от потока ионов (протонов или натрия) через внутреннюю мембрану, вызывая конформационные изменения, которые передают крутящий момент на цитоплазматическое С-кольцо, которое, в свою очередь, соединено со стержнем, крюком и филаментом. Пропульсивная сила, создаваемая этим вращением, обеспечивает плавание со скоростью от 25-35 мкм/с у *Escherichia coli* [117] до 160 мкм/с у *Bdellovibrio bacteriovorus* [110]. Диапазон скоростей, по-видимому, обусловлен многими факторами, включая форму клетки [209], источник энергии для молекулярного мотора [15] и широкое структурное разнообразие жгутиковых моторов у разных бактерий [118]. Баланс между крутящим моментом и скоростью вращения молекулярного мотора изучался в нескольких системах и, по-

видимому, этот механизм может адаптировать свою работу для получения большей мощности или большей эффективности в зависимости от энергетических параметров клетки [113, 180].

В формировании и функционировании жгутиков участвует более 50 генов [121]. У *E. coli* около 2 % всех энергетических затрат клетки идет на поддержание функционирования жгутиков, при этом экспрессия жгутиковых генов в значительной степени регулируется условиями окружающей среды. Вклад жгутиков в патогенность заключается в следующем: (1) жгутики облегчают адгезию, выполняя функцию бактериальных адгезинов и обеспечивая подвижность [14], (2) флагеллы способствуют формированию бактериальных биопленок, поддерживающих выживание патогена *in vivo* [144], (3) посредством транслокации белки вирулентности транспортируются в клетки хозяина через систему секреции III типа [109] и (4) вызывают воспалительную реакцию при активации рецептора TLR5 [84].

Важность жгутиков для инвазии в эпителиальные клетки была показана для нескольких видов бактерий [61, 148]. Так, *L. monocytogenes*, лишенные жгутиков, внедряются в клетки Caco-2 (иммortalизованная клеточная линия клеток колоректальной аденокарциномы человека) примерно в четыре раза менее эффективно, чем штамм, имеющий флагеллы [61]. Жгутики участвуют и в патогенезе инфекции, вызванной энтерогеморрагической инфекцией *E. coli* (ЕНЕС) O113:H21, способствуя инвазии в кишечный эпителий: делеция *fliCH21*, ключевого гена, кодирующего флагеллярный белок флагеллин, из ЕНЕС O113:H21 приводила к восьмикратному снижению эффективности инвазии [119].

Флагеллярная система секреции III типа: связь подвижности с вирулентностью. Системы секреции III типа (ТЗСС) необходимы для патогенности некоторых грамотрицательных бактерий и играют важнейшую роль во взаимодействии хозяин-патоген. ТЗСС экспортируют и с помощью инъектисомы вводят факторы патогенности в организм хозяина,

непосредственно влияя на метаболизм. Аппараты секреции III типа кодируются примерно 25 генами [119]. Бактериальный жгутик – это особый аппарат системы секреции III типа, который происходит от общей предковой системы и имеет по меньшей мере девять гомологичных компонентов с T3SS, связанных с вирулентностью

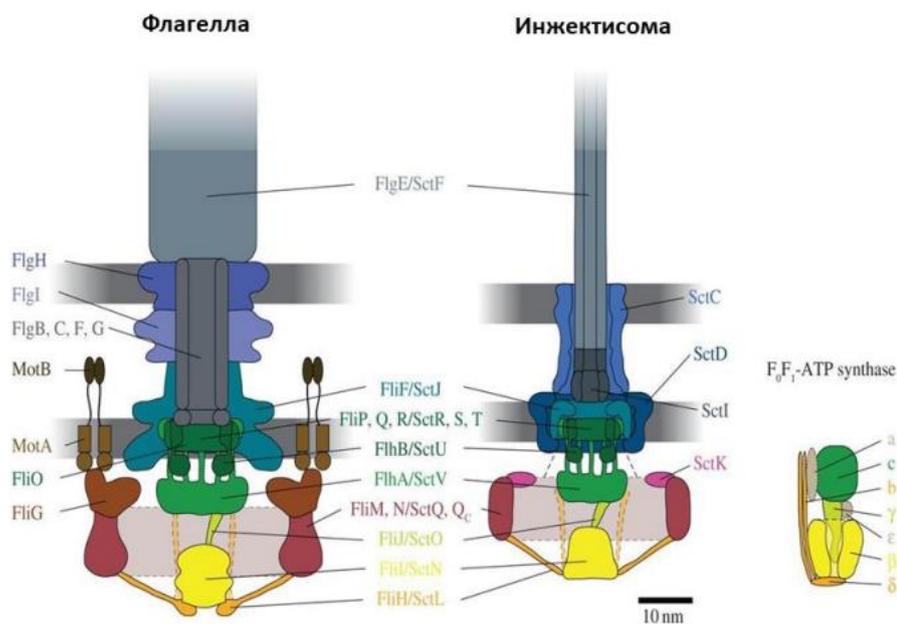


Рисунок 4. Структура флагеллы и инъектисомы и сравнение со структурно родственными частями АТФ-синтазы. На рисунке обозначения белков даны с использованием унифицированной номенклатуры [60].

Экспортный аппарат жгутика находится внутри структуры базального тела. Ядро экспортного аппарата состоит из шести трансмембранных белков (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ и FliR), которые образуют комплекс экспортных каналов внутри MS-кольца [122]. Три цитозольных белка, FliH, FliI и FliJ, необходимы для экспорта белков жгутика и взаимодействуют с каналом, тем самым участвуя в работе экспортного аппарата. Белок жгутикового С-кольца FliN также является частью экспортного аппарата [159]. Эти две секреторные системы структурно и функционально пересекаются, поскольку в некоторых

случаях они экспортируют в клетки хозяина одни и те же или сходные факторы патогенности [122].

Жгутиковая T3SS может быть дополнительным механизмом экспорта факторов патогенности. Ранее считалось, что экспортная система жгутика отвечает исключительно за секрецию белков, участвующих в биогенезе филамента. Однако последние данные показали, что специфический для жгутика экспортный аппарат выполняет двойную функцию: для экспорта собственных белков жгутиков и для секреции факторов вирулентности у ряда патогенов. Первым обнаруженным неструктурным флагеллярным белком был FlgM, антисигма-фактор, секретируемый специальным флагеллярным секреторным аппаратом [88]. FlgM негативно регулирует транскрипцию жгутиковых генов класса III и секретируется во внеклеточную среду сразу после завершения формирования базального тела и частей крюка и подготовки к сборке жгутиковых нитей [88]. Продолжают накапливаться данные о том, что некоторые компоненты жгутикового аппарата участвуют в экспорте детерминант вирулентности у ряда патогенов. Например, секреция вирулентно-ассоциированной фосфолипазы *Y. enterocolitica* (YplA) и некоторых вирулентных детерминант *Bacillus thuringiensis* зависела от функционального жгутикового экспортного аппарата [79, 209]. Из-за отсутствия классической T3SS жгутиковый экспортный аппарат играет основную роль в секреции факторов вирулентности при изменении вирулентности *Campylobacter jejuni*. Эти белки вирулентности, по-видимому, принадлежат к одному из двух классов. К первому относятся около восьми белков *Campylobacter invasion antigen* (Cia), которые необходимы для инвазии в эпителиальные клетки кишечника некоторыми штаммами *C. Jejuni* [17, 109]. Секреция белков Cia требует наличия полноразмерного жгутика, при этом отсутствие жгутика приводит к значительному снижению эффективности инвазии [109]. Второй класс секретируемых белков включает FlaC и FspA, которые секретируются через жгутиковый филамент без специальных сигналов [179].

Жгутиковая нить *E. coli* образована ~30 000 копиями флагеллина, FliC. У сальмонелл, помимо гена *fliC*, есть ген *fljB*, кодирующий еще одну субъединицу флагеллина. Поскольку флагеллин является основной мишенью для иммунной системы хозяина (H-антиген), наличие дополнительной субъединицы флагеллина позволяет сальмонеллам более эффективно уходить от адаптивного иммунного ответа хозяина по сравнению с *E. coli* [39]. *Salmonella* FliC состоит из четырех доменов D0, D1, D2 и D3, расположенных от внутренней к внешней части филаментной структуры. Домены D0 и D1 высококонсервативны, в то время как домены D2 и D3 изменчивы даже среди *Salmonella* spp.

Строение жгутиковой нити тесно связано с ее функцией. Сверхсвернутые формы филаментов образуются в результате комбинации двух левосторонних (L-тип) и правосторонних (R-тип) спиральных конформаций молекулы флагеллина и взаимодействий протофиламентов L- и R-типа, поэтому свойства каждой суперспирали определяются соотношением протофиламентов L-типа и R-типа [100]. Межмолекулярное расстояние вдоль прямой нити L-типа, состоящей только из протофиламентов L-типа, на 0,8 Å больше, чем у R-типа, состоящего из протофиламентов R-типа [207]. Это различие в длинах приводит к механическому напряжению на каждом протофилamente, вызывая скользящее движение между субъединицами флагеллина вдоль протофиламента при резком изменении скорости вращения мотора. В результате изменяется структура филамента с L-типа суперспирали на R-тип, что приводит к распаду пучка жгутиков и смене траектории движения с пробега на кувырок [167]. Недавний анализ изображений с помощью электронной криомикроскопии высокого разрешения (cryoEM) прямых филаментов L- и R-типа *Bacillus subtilis* и *P. aeruginosa*, показал, что переключение сверхсвернутых форм этих флагеллярных филаментов происходит аналогично филаменту *Salmonella* [202].

Многие виды бактерий, в отличие от *E. coli* и *Salmonella* имеют жгутики, образованные субъединицами флагеллина разных типов, что влияет на

механические свойства жгутиковой нити [71, 106, 110, 171]. В настоящее время проводятся исследования по изучению связи типов флагеллинов с приспособленностью микроорганизмов к условиям окружающей среды, в которой они обитают [134, 169].

1.3.1. Хемотаксис.

Бактерия, которая очень мала даже по сравнению с эукариотической клеткой, не говоря уже об организме хозяина или внешней среде, в трехмерном пространстве не может полагаться только на хаотические перемещения или диффузию. Поэтому кроме способности к движению у бактерий появились системы, позволяющие перемещаться в нужном направлении, то есть способность к хемотаксису. Хемотрецепторные системы бактерий в сочетании с жгутиками позволяют микроорганизму двигаться в нужном направлении, задерживаться рядом с потенциальными мишенями или благоприятными нишами, детектировать достижение цели, и запускать изменения, чтобы оставаться в этой области.

Хемотаксис – это процесс, при котором бактерии активно регулируют направление движения, чтобы приблизиться к аттрактантам и избежать репеллентов [4, 13]. Это движение возможно благодаря ощущению химического градиента хемотрецепторами. Хемотаксис регулируется сетью взаимодействующих друг с другом белков. Сенсорный сигнал обрабатывается и передается флагеллярному мотору цитоплазматическими белками.

Метил-акцепторные хемотрецепторные белки образуют крупные группы, которые сложным образом регулируют уровень фосфорилированного сигнального белка CheY при движении к репелленту или от аттрактанта [42]. У *E. coli* фосфорилированный CheY запускает переход от линейного плавания к беспорядочному кувырку и переориентации, взаимодействуя с C-кольцом жгутика, чтобы переключить его вращение с направления против часовой стрелки на противоположное. Это приводит к более частым кувыркам при движении в неблагоприятных направлениях. И наоборот, низкий уровень

фосфорилированного CheY позволяет жгутиковому мотору работать против часовой стрелки непрерывно, удлиняя промежутки относительно прямолинейного движения в благоприятных направлениях. В настоящее время известно, что детектируемыми стимулами могут быть не только химические вещества, как это характерно для хемотаксиса, но и свет (фототаксис), поток жидкости (рентаксис), осмолярность (осмотаксис), температура (термотаксис) и прикосновение (тигмотаксис) [13].

Для микроорганизмов, инфицирующих животных, хемотаксис позволяет обеспечить направленную колонизацию участков организма хозяина. Такие патогены, как *Helicobacter pylori* и *Campylobacter jejuni* предпочитают колонизировать слои слизи в желудочно-кишечном тракте млекопитающих. Хемотаксис позволяет *H. pylori* предпочтительно колонизировать места повреждения слизистой оболочки желудка [6], а хемоаттрактанты, такие как муцины и гликопротеины, которые являются основными компонентами слизи, стимулируют *C. jejuni* колонизировать заполненные слизью крипты в кишечнике [38]. Другие патогены должны взаимодействовать с клетками и тканями: *Salmonella spp.*, по-видимому, активно перемещаются через слой слизи хемотаксическим способом в направлении кишечного эпителия, чтобы ввести эффекторный белок в клетки хозяина, что делает хемотаксис необходимым для эффективной колонизации кишечника в мышинных моделях [182]. *Vibrio cholerae* также использует хемотаксис для колонизации эпителия преимущественно нижней половины тонкой кишки, что примерно соответствует нижней части тощей и подвздошной кишки. Интересным фактом является наблюдение, что в отсутствие хемотаксиса *V. cholerae* способен колонизировать тонкую кишку одинаково хорошо по всей длине и с 10-кратным снижением необходимой инфекционной дозы [37, 44, 45]. Исследование этого необычного фенотипа *V. cholerae* с дефицитом хемотаксиса показало, что как хемотаксисные, так и нехемотаксисные штаммы начинают колонизацию верхней половины кишечника одинаково, но обладающие хемотаксисом штаммы колонизируют дополнительно глубокие

межворсинчатые пространства кишечника, откуда они более эффективно элиминируются с помощью неизвестного антибактериального механизма. Неспособные к хемотаксису штаммы оставались в слое слизи в верхней части тонкой кишки, где они, вероятно, избегали эффекта этого защитного механизма организма хозяина [73].

Таким образом, хемотаксис может играть для микроорганизмов как положительную роль, улучшая эффективность колонизации, так и ограничивать распространение микроорганизмов.

1.4. Оценка и анализ подвижности бактерий.

Различают макроскопические и микроскопические методы изучения подвижности бактерий. Классический подход к изучению макроскопической подвижности заключается в исследовании распространения бактерий в полужидком агаре [191]. Неподвижные бактерии остаются вблизи области их инокуляции в агар методом прокола, в то время как подвижные распространяются, что визуализируется как помутнение толщи агара (рис. 5). Благодаря своей простоте этот метод особенно хорошо подходит для выявления неподвижных или подвижных штаммов.

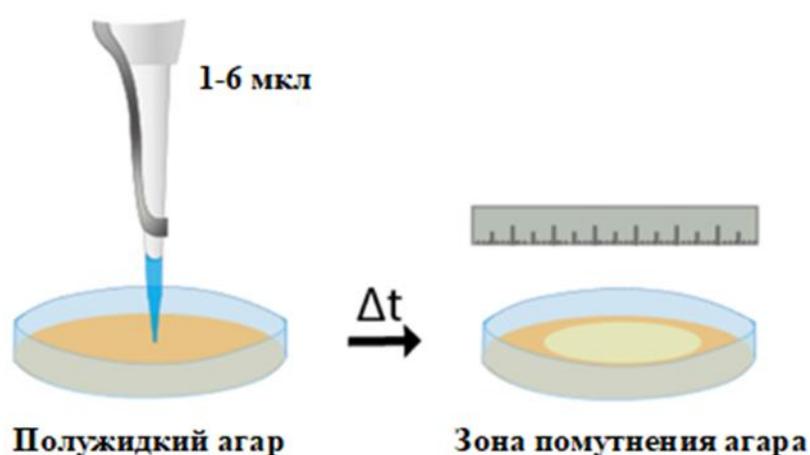


Рисунок 5. Оценка подвижности в полужидком агаре [147].

Микроскопические методы оценки подвижности позволяют более точно охарактеризовать паттерны движения, и с развитием методов микроскопии даже оценивать поведение бактерий в объеме жидкости. Наиболее старым методом была оценка подвижности бактерий в препарате «раздавленной» или «висячей» капли. На основе наблюдений за движением микроорганизмов в висячей капле была сформулирована первая модель плавательного поведения «пробег и кувырок» [135]. В настоящее время для характеристик паттернов движения бактерий используют трехмерную микроскопию, которая позволяет воссоздать траектории в объеме жидкости.

Основы механики движения бактерий. На характер подвижности бактерий влияет целый ряд факторов. Во-первых, количество и расположение флагелл [50]. Механика аппарата движения в сочетании с особенностями морфологии бактерий (кокки, палочковидные, извитые) приводит к разным типам подвижности (углу поворота, пробегу-кувырку или маятникообразному движению) [41] и поведению (плавание, роение) [83, 94]. Факторы окружающей среды (химический состав, вязкость, температура, pH, химические особенности поверхностей) также влияют на бактериальную подвижность [58, 133].

Механику движения микроорганизмов, взаимодействующих с окружающей жидкостью, изучает гидродинамика. Благодаря небольшим размерам (в среднем не превышающим 2 мкм в длину) бактерии движутся через слои жидкости, в то время как макроскопические объекты полагаются на инерцию. Множество бактерий перемещается благодаря вращению одного спирального жгутика или пучка жгутиков, приблизительно 10 мкм в длину.

Движение бактерий напоминает броуновское движение, то есть хаотическое перемещение частиц под действием тепловой энергии [21]. Бактерии неспособны двигаться в одном направлении даже в течение нескольких секунд, так как броуновское движение постоянно толкает их в разные направления [34]. Эффект броуновского движения снижается при

увеличении размеров клеток [64]. Например, при 32⁰С трансляционная и ротационная диффузия вызывает смещение траектории кишечной палочки от первоначального курса примерно на 27⁰ за 1 с [26]. Для бактерий, в 20 раз более крупных, чем кишечная палочка (*Chromatium minus*), этот эффект был менее выраженным, но тем не менее, тоже наблюдался [136].

Для противостояния броуновскому движению плавание перитрихов состоит из двух альтернативных фаз: относительно длинной и прямолинейной фазы «пробега», длящейся до 1с, и короткого «кувырка», длящегося 0,1с. Флагеллы образуют левозакрученный пучок во время движения. Он вращается против часовой стрелки с частотой приблизительно 10Гц [56]. Достаточно отделения одной флагеллы от пучка, чтобы он распался, и наступила фаза «кувырка».

Полярные монотрихи, которые обитают в водной среде, не кувыркаются и плавают быстрее, чем перитрихи [154]. Их жгутик может быть как право-, так и левозакрученным. Правозакрученный жгутик вращается по часовой стрелке и двигает клетку вперед; левозакрученный жгутик вращается против часовой стрелки. Когда меняется направление вращения жгутика, клетка движется назад. Этот поворот функционально эквивалентен кувырку перитрихов (Tomonobu Goto 2005). Без внешних воздействий плавание назад должно позволить бактерии проследовать той же траекторией в обратном направлении. Но броуновское движение заставляет монотрихов плавать зигзагообразно [81, 187].

Другие бактерии, например, фотосинтезирующий *Rhodobacter sphaeroides*, используют броуновское движение для реориентации клеток между фазами прямолинейного движения [12].

Вне зависимости от того, какую стратегию передвижения использует бактерия, ее траектории преимущественно представляют собой хаотические перемещения («random walks») [12, 25], однако, меняя длину направленного движения, то есть, пробега, бактерии могут перемещаться направленно и

мигрировать в благоприятные для жизни области. Было установлено, что, контролируя количество реверсивных флагелл, перитрихи способны уменьшить угол кувырка на 3 градуса при движении в сторону аттрактанта [199].

1.4.1. Ориентация клеток при движении у твердой поверхности

Когда кишечная палочка перемещается в ламинарном потоке, она ориентируется параллельно нему с небольшим наклоном вперед и вниз [85]. Гидродинамическая теория предсказывает, что несферические клетки, плавающие вблизи твердой поверхности, подвергаются силе трения как со стороны стенки, так и слоя жидкости сверху [86], в связи с чем их траектории становятся круговыми. Монотрихи, как и перитрихи, также имеют круговые траектории при плавании у поверхности. Однако круговое движение у них наблюдается только при перемещении назад [81, 111]. Вперед они движутся преимущественно прямолинейно, хотя скорость движения снижается при приближении клеток к поверхности. Это же было показано и для *P. aeruginosa*.

Сферические клетки лишённые флагелл должны испытывать только сопротивление стенки, и, следовательно, будут катиться вдоль поверхности [196]. Гидродинамические взаимодействия предотвращают столкновение бактериальных клеток с дном и ориентируют их параллельно поверхности [158]. Вследствие пристеночного эффекта приближение клеток к поверхности должно приводить к асимптотическому снижению скорости, что должно заканчиваться притягиванием бактерий и тесным контактом [111]. Есть данные, что кишечная палочка обычно плавает на расстоянии 40 нм над чистым кварцевым стеклом [196] и ее скорость падает до 16 мкм/с при приближении к поверхности [76]. Компьютерная симуляция подтверждает, что расстояние от клетки до поверхности должно измеряться нанометрами и что удлиненные клетки плавают дальше от стенки, чем более округлые [176].

1.4.2. Паттерны движения на открытых пространствах

Микрофлюидические устройства [165, 211] обычно используются для манипулирования отдельными клетками или небольшими популяциями клеток в микрометровых каналах для медицинской диагностики [69], скрининга лекарственных препаратов [212], сортировки клеток [210], детекции [208] и генетического анализа отдельных клеток [99]. В работе Viola Tokarova et al. [193] рассматривали поведение 5 разных видов микроорганизмов в микрофлюидических камерах разной геометрии. В результате с использованием 3D визуализации отдельных бактерий были получены интересные данные об особенностях движения в широких микрофлюидических камерах высотой 6 мкм. Так, было установлено, что бактерии имели разные паттерны подвижности в зависимости от удаленности от вертикальных стенок и углов. Кишечная палочка, *Vibrio fisheri*, *Vibrio natriegens*, например, двигались на небольшой дистанции от вертикальных стенок. *Magnetococcus marinus* распределялся неравномерно вблизи вертикальных стенок благодаря частым столкновениям с ними, напоминая игру в пинг-понг. *Pseudomonas putida* распределялся, наоборот, равномерно, по камере [193].

Было установлено, что самые длинные траектории бактерий были наиболее видоспецифичны. Так, *V. natriegens*, *E. coli* и *V. fisheri* демонстрировали два типа траекторий: 1) движение вдоль вертикальных и горизонтальных стенок и, при откреплении 2) круговые движения. Круговые движения наблюдались до той поры, пока бактерии вновь не прикреплялись к вертикальным стенкам. *M. marinus* демонстрировал пинг-понг подобные движения и столкновения с вертикальными поверхностями. Вдоль вертикальных или горизонтальных стенок прямолинейного движения не наблюдалось, при этом не были и обнаружены замкнутые кольцевые траектории. Самые длинные траектории имел *P. putida*, микроорганизмы обладали двумя типами движения: относительно прямыми через всю площадь камеры и круговыми. Длинные траектории по периметру камеры, которые

были характерны для *V. natrieigen*, *E. coli* и даже *V. fischeri* не были характерны для *P. putida*.

Таким образом, в квазиоткрытых пространствах, когда передвижение ограничено только параллельными вертикальными или горизонтальными плоскостями, расположенными на расстоянии, значительно превышающем размер бактерий, направление движения микроорганизмов можно приблизительно описать как перемещение параллельно плоскости, удаление от вертикальной поверхности или – реже – накопление в области вертикального объекта.

1.4.3. Паттерны движения в каналах разной ширины.

При движении в линейных каналах (6-8 мкм шириной) кишечная палочка и *V. natrieigen* двигались преимущественно вдоль стенок, что коррелировало с их подвижностью на открытых пространствах.

При этом *P. putida* демонстрировал синусоидное движение. *V. natrieigen*, *V. fischeri* и, в гораздо меньшей степени, кишечная палочка также обладали синусоидными характеристиками движения, и длина волны увеличивалась пропорционально ширине канала. *M. marinus* также обладал траекториями движения, похожими на синусоиду, но анализ показал, что такое движение является лишь результатом частых столкновений со стенками и отскакивания от них.

В более узких каналах (т.е. от 3 до 6 мкм) бактерии были вынуждены перемещаться вдоль оси, за исключением *M. marinus*). Более того, в более узких (но все же больших, чем поперечный размер клетки) каналах движение бактерий, по-видимому, облегчается как за счет гидродинамики, так и за счет пространственного взаимодействия со стенками, которые синергетически направляют бактерии двигаться в одном направлении [32].

Расчеты показывали, что в прямых каналах при уменьшении их ширины траектории движения бактерий должны в большей степени определяться пространственными взаимодействиями в ущерб гидродинамике. Большой вклад именно влияния пространственных взаимодействий может объяснить видоспецифичную долю U-образных поворотов. Виды с наименьшим соотношением жгутик/длина/тело клетки (т.е. *V. natriegens* и *E. coli*) имели наименьшую долю разворотов. При этом количество таких разворотов было тем меньше, чем шире был канал. И наоборот, виды, имеющие более высокие значения соотношения жгутик/длина/тело клетки имели более высокую долю разворотов. *M. marinus*, с его характерными частыми столкновениями и отскоками от стенок имел минимальное число разворотов во всех каналах, за исключением каналов шириной 2 мкм. Это уникальное поведение может быть объяснено стерическими взаимодействиями *M. marinus* с обеими стенками канала, в результате чего бактериальная клетка оказывается “зажатой” ими и переворачивается в вертикальной плоскости канала высотой 6 мкм с последующим перемещением в противоположном направлении.

Таким образом, эти результаты демонстрируют, что, при наличии сильной и сложной связи между взаимодействием параллельных стенок, расположенных на расстояниях, аналогичных размерам бактерий, подвижность бактерий, в первую очередь, определяется локальными пространственными взаимодействиями между стенками и жгутиками, а в экстремальных условиях - телом клетки. В каналах сложной геометрии, таких как извилистые каналы, подвижность, обусловленная гидродинамикой, преобладает в более широких каналах, а механизм, основанный на локальных пространственных взаимодействиях, управляет подвижностью бактерий в более узких каналах.

Фундаментальное понимание механики движения монофлагеллярных [174–176] и даже бифлагеллярных [173] бактерий при простой геометрии не может точно предсказать характер движения бактерий [193]. Детальный анализ влияния изменчивости популяции на поведение микроорганизмов,

разработка новых более сложных моделей, учитывающих анатомию и морфологию бактерий, особенности поверхности, а также необходимость проведения систематических валидационных исследований необходимы для оптимизации микрофлюидических устройств с определенными функциями (например, для одноклеточного геномного скрининга; обнаружения редких клеток; устройств для улавливания бактерий для диагностики или оценки антибиотикорезистентности).

Таким образом, несмотря на большое количество фундаментальных исследований о строении и функционирования жгутиков, особенностях движения бактерий в каналах разной ширины и конфигурации, несмотря на наличие математических моделей, описывающих параметры, влияющие на гидродинамические свойства бактерий, до сих пор связь подвижности с способностью эффективно колонизировать различные абиотические и биотические поверхности и проникать внутрь клеток хозяев установлена для сравнительно узкого спектра видов микроорганизмов. Это связано, в первую очередь, с тем, что работы, посвященные анализу характеристик подвижности бактерий, выполнены преимущественно специалистами-биофизиками на моделях непатогенных микроорганизмов. Оригинальность данной работы заключается в сравнении паттернов приповерхностного движения и связи этих характеристик с адгезией и инвазией патогенных бактерий в сравнении с непатогенными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Таблица 1. Микроорганизмы, использованные в работе

Вид	Штамм	Генотип	Источник	Серовар	Подвижность
<i>L.monocytogenes</i>	EGDe	Дикий тип	Типовой штамм	1/2a	+ при температуре 22-25 ⁰ C, - при температуре 37 ⁰ C
<i>L. innocua</i>	SLCC 3379	Дикий тип	Типовой штамм	6a	+
<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	Дикий тип	Типовой штамм	-	+
<i>L. seeligeri</i>	SLCC 5921	Дикий тип	Типовой штамм	1/2b	+
<i>Escherichia coli</i>	JM 109	F' traD36 proAB lacI ^q Δ(lacZ)M15/end A1 recA1 gyrA96(Nal ^r) thi hsdR17 (rk ⁻ mk ⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB)	Лабораторный штамм	K12	-
<i>Escherichia coli</i> (Migula)	ATCC 43890	Дикий тип	Клинический изолят	O157:H7	+

Castellani and Chalmers					
<i>Escherichia coli</i>	M17	Дикий тип. Номер в базе данных в GenBank LBDD000000000 .1	Пробиотический штамм	O2:H6	+

Изучение подвижности бактерий было проведено с использованием трех штаммов кишечной палочки и четырёх видов листерий из коллекции ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Виды и штаммы, представленные в таблице 1.

Для проведения иммуноферментного анализа были использованы следующие реактивы

Таблица 2. Реактивы для проведения ИФА

Буфер для иммобилизации	0,1 М Na-карбонатный буфер, pH=9.4.
Отмывающий буфер	500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6
Блокирующий буфер	2% БСА (Amresco, США) в PBS
Раствор для разведения стандартов	Блокирующий буфер с Tween-20 0,05 %
Субстрат	1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific, США)
Раствор для остановки реакции	2 М H ₂ SO ₄ (Русхим, Россия)

2.2. Микробиологические методы

2.2.1. Условия культивирования

Все культуры хранили замороженными при -70°C в 10% глицерине. Перед началом эксперимента образец отбирали стерильной петлей, которую высевали на соответствующую среду.

Штаммы *E. coli* рутинно выращивали на жидкой и твердой питательной среде Лурия–Бертани LB (Amresco, США) при 37°C . *E. coli* JM109 – непатогенный слабоподвижный штамм, *E. coli* ATCC43890 – энтеропатогенный подвижный, *E. coli* M17 – пробиотический подвижный штамм.

Культивирование бактерий рода *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*) рутинно проводили на среде ВНИ (Amresco, США). Для инкубации *L. monocytogenes* и *L. innocua* использовали температуру 25°C и 37°C . Режимы выбирали, исходя из влияния температуры на подвижность бактерий. При выращивании при 25°C большая часть популяции *L. monocytogenes* подвижна, а при 37°C неподвижна. Для *L. innocua* различия в подвижности в зависимости от температурного режима не характерны. Для получения ночной культуры в жидкой питательной среде бактерии выращивали в течение 18 ч при покачивании со скоростью 180 оборотов в минуту.

2.2.2. Оценка подвижности бактерий в полужидком агаре

Для оценки подвижности бактериальных клеток их выращивали в полужидком агаре и определяли зону удаления бактерий от точки введения замером диаметра помутнения питательной среды. Для этого в чашки Петри заливали агаризованную питательную среду (ВНИ и LB) с 0,3 и 0,5% содержанием агара для листерий и кишечной палочки, соответственно. После застывания среды проколом вносили колонию микроорганизма. Учет

результатов проводили через 18-24 ч инкубации при 25°C и 37°C в зависимости от вида микроорганизма.

2.2.3. Конструкция микрофлюидической камеры

Для изучения движения бактерий на 3D принтере из прозрачной смолы (Anycubic Photon, Китай) были напечатаны микрофлюидические камеры. Они представляли собой модифицированную камеру Горяева с каналом глубиной 30 мкм и шириной 10 мм, к поверхности которой притирали покровное стекло (рис.6.).

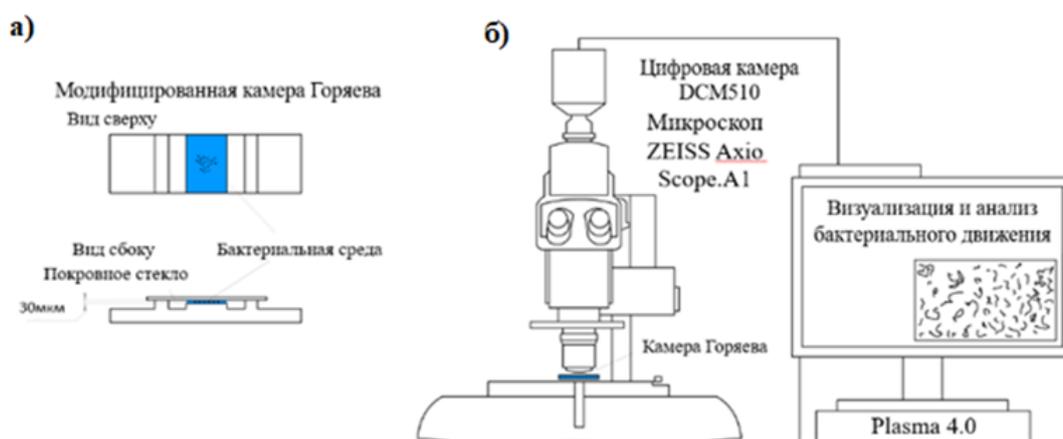


Рисунок 6. общий вид используемой модифицированной камеры Горяева (а) и схема эксперимента (б).

2.2.4. Оценка подвижности в средах с различной вязкостью и концентрации

Для оценки подвижности в средах с различной вязкости и концентрации *L. monocytogenes* рутинно выращивали на жидкой питательной среде ВНІ (Amresco, США) при 25°C. Для поиска различий в подвижности были взяты различные среды: PBS, 1% раствор метилцеллюлозы (МЦ), и 2М раствор

сахарозы, и различные концентрации бактерий (оптические плотности OD₆₀₀ = 0,4; 2 и 10).

2.2.5. Оценка паттернов подвижности бактерий

В микрофлюидическую камеру вносили бактериальную суспензию с OD₆₀₀ = 2,0, что соответствовало 10⁹ клеток/мл. Бактериальную суспензию вводили в микрофлюидическую камеру с последующей видеовизуализацией при 400-кратном увеличении. Для этого камеру помещали на предметный столик микроскопа Zeiss Axio Scope A1, оснащенного цифровой камерой DCM510 (Китай), которая передавала видеоизображения с разрешением 1280x960 пикселей. Подготовка образца и наблюдение занимало примерно 10-15 минут, за это время снимали серию видеороликов продолжительностью 30 секунд со скоростью 30 кадров в секунду. Размер наблюдаемого поля зрения составлял ~81x86 мм², глубина резкости составляла 5–10 мкм. Было записано не менее 5 видео для каждого образца, все эксперименты проводились 3 раза.

Таким образом, наблюдение за бактериями проходило в среднем слое, т. е. на расстоянии 10-15 мкм как от дна канала, так и от стекла (рис.6а).

Для характеристики движения были записаны короткие видеоролики, которые впоследствии были обработаны для восстановления траекторий в пределах слоя наблюдения. Для обработки и анализа видео было вырезано примерно 10 секунд видеопотока. Отобранные видео были обработаны с использованием специально разработанного программного обеспечения Plasma 4.0, в котором осуществлялось статистическое "вычитание" фона.

2.2.6. Адгезия микроорганизмов к пластику

E. coli рутинно выращивали в среде Лурии–Бертани (LB), разводили в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS). Эффективность адгезии к абиотической поверхности была оценена в 24-луночной планшете из полиэтилентерефталата. 3x10⁶ кл/мл были добавлены в каждую лунку 24-

луночного планшета. Для оценки эффективности адгезии листерий, выращенные в сердечно-мозговом бульоне (ВНІ) культуры к пластику бактериальную суспензию с оптической плотностью 2 (OD_{600}) вносили по 2 мл в каждую лунку 24-луночного планшета. Через 15, 30 и 60 мин инкубации жидкость удаляли и лунки трижды промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS), после чего делали смыв адгезировавшихся бактерий при помощи стерильной ватной палочки. Далее делали серию десятикратных разведений с последующими высевами на твердую питательную среду. По истечении 18 часов инкубации в термостате при 37°C подсчитывали количество колониобразующих единиц (КОЕ).

2.2.7. Адгезия *E. coli* ATCC43890 в клетки HEp-2

Клетки высевали в 24-луночный планшет и при достижении среднего числа 300 000 клеток/лунка питательную среду заменяли 1 мл суспензии *E. coli* соответствующего штамма в соотношении 1:100 (100 бактерий на 1 эукариотическую клетку). После 15, 30 и 60 минут инкубации бактериальную суспензию удаляли, а поверхность лунок трижды промывали стерильным PBS. Для лизиса эукариотических клеток PBS удаляли и добавляли 100 мкл 1% Triton X-100. Через 15 секунд в лунки вносили 900 мкл PBS и тщательно ресуспендировали образец. Делали серию десятикратных разведений с последующими высевами на питательную среду.

2.2.8. Адгезия подвижных и неподвижных листерий к клеткам HEp-2

18-часовые культуры листерий, выращенные в сердечно-мозговом бульоне (ВНІ) при температуре 25°C или 37°C, разводили в свежей среде ВНІ или в фосфатно-солевом буфере. Выращенный при 25°C *L. monocytogenes* разбавляли свежим ВНІ (1:9 культуры) и инкубировали при той же температуре в течение 7 ч. После анализа влияния изменения температуры культуру разводили, а затем инкубировали при 25°C в течение 5 часов. После

этого полученную бактериальную суспензию разделили на два образца, один из которых выдерживали при тех же условиях, в то время как другой переставили на 37°C, и образцы выращивали еще 2 ч, чтобы общее время инкубации составило 7 ч. Во всех остальных случаях разбавляли в фосфатно-солевом буфере до достижения оптической плотности (OD_{600}), равной 2, что соответствует концентрации бактерий 10^9 кл/мл.

Клетки аденокарциномы гортани HEp-2 культивировали в DMEM (Панеко, Россия) с добавлением фетальной бычьей сыворотки 10% от объема (GIBCO, США) без добавления антибиотиков при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для оценки уровня адгезии бактерий эукариотические клетки высевали в 24-луночный планшет и по достижении 70% монослоя в каждую лунку добавляли по 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 10^9 кл/мл. Через 15 и 60 минут инкубации удаляли раствор с бактериями и тщательно трижды промывали каждую лунку стерильным раствором фосфатно-сульфатного буфера. Затем на 15 секунд вносили 100 мкл 1% тритона X100, после чего добавляли 900 мкл стерильного фосфатно-сульфатного буфера, тщательно ресуспендировали полученную суспензию и делали серию десятикратных разведений с последующими посевами на твердую питательную среду. Через 18 часов инкубации при 37°C подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Для оценки эффективности адгезии подвижных бактерий с активированным повышением температуры *prf* регулоном ночную культуру *L. monocytogenes EGDe* получали стандартным способом при 25°C. Затем ее инкубировали 2 ч при температуре 37°C и проводили адгезию к клеткам HEp-2 согласно описанному выше способу.

2.2.9. Инвазия *L. monocytogenes* в клетки HEp-2

Эффективность инвазии *L. monocytogenes* в клетки HEp-2 исследовали с использованием гентамицинового теста. Клетки HEp-2 культивировали в DMEM (Paneco, Россия) с добавлением 10% по объему фетальной бычьей сыворотки (GIBCO) без антибиотиков при 37°C и в атмосфере 5% CO₂. По достижению в 24-луночном планшете 70% монослоя клеток HEp-2 в каждую лунку вносили по 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 10⁹ кл/мл, через 15 и 60 минут инкубации суспензию удаляли, а лунки тщательно промывали стерильным раствором PBS трижды. Затем в лунки вносили 1 мл питательной среды, содержащей гентамицин в концентрации 100мкг/мл, и инкубировали 60 мин для достижения гибели внеклеточных листерий. После удаления антибиотика лунки трижды промывали стерильным PBS и вносили 100 мкл 1% Triton X-100 для лизиса эукариотических клеток. Через 15 секунд, когда клеточные мембраны лизировались, в каждую лунку добавляли 900 мкл PBS и тщательно ресуспендировали образец. После этого делали серию десятикратных разведений с последующими высевами на питательную среду. Подсчет колоний проводился через 24 ч инкубации при 37°C.

2.2.10. Иммуноферментный анализ

Бактериальные клетки культивировали в течение 24 часов на среде ВНИ, а затем центрифугировали и промывали трижды PBS. Полученные образцы доводили до оптической плотности 0,2 (OD₆₀₀). Для оценки количества мембранного белка-инвазина листерий интерналина В (InIB) в лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл приготовленных суспензий. Планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи, трижды промывали по 250 мкл TBST (трис-буферный физиологический раствор с 0,05% Твин-20), а затем свободные участки связывания блокировали добавлением 200 мкл 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA), растворенного в TBST. После 30-минутной инкубации блокирующий буфер удаляли и добавляли 100 мкл конъюгата

кроличьих поликлональных InlB-специфичных антител с пероксидазой хрена (анти-InlB-HRP; [Kalinin 2023]), разведенных в блокирующем буфере 1:4000. Бактерии инкубировали с анти-InlB-HRP при комнатной температуре и встряхивании при 140 об./мин в течение 1 часа. Затем лунки промывали TTBS (смесь трис-буферного солевого раствора (TBS) (буферный раствор) и полисорбата 20 (неионогенное поверхностно-активное вещество типа полисорбата)) 6 раз и выявляли ферментативную активность пероксидазы хрена, используя 100 мкл субстрата TMB (Bio-Rad, США). Для прекращения реакции добавляли 100 мкл 2 М серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм с использованием планшетного фотометра iMark (Bio-Rad). Количества InlB определяли относительно калибровочной кривой, построенной с использованием очищенного белка.

2.2.11. Визуализация бактериальных и эукариотических клеток

Для приготовления образцов адгезировавшихся на пластике бактерий в 24-луночный планшет помещали предварительно вырезанные фрагменты из пластика площадью 1 см². 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 10⁹ кл/мл вносили в каждую лунку и инкубировали 15 и 60 мин, после чего адгезировавшиеся бактерии окрашивались красителем Hoechst 33342 (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя.

Для визуализации бактерий на поверхности эукариотических клеток культуру HEp-2 выращивали на покровных стеклах до формирования 70% монослоя. Затем из лунок отбирали питательную среду и вносили по 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 10⁹ кл/мл на 15 мин и 60 мин. По истечении данного времени из каждого планшета удаляли жидкость, образцы трижды промывали стерильным PBS и фиксировали 3,7% нейтральным формальдегидом 10 минут. После удаления формальдегида образцы снова трижды промывали стерильным PBS, затем окрашивали Hoechst 33342 (ThermoFisher, США) в соответствии с инструкцией производителя 15 минут.

Для дальнейшей визуализации бактерий, адгезировавшихся на клетках и пластике, использовали флуоресцентную микроскопию при увеличении в 1000 раз с помощью микроскопа Zeiss Axio Scope A1, оснащенного цифровой камерой DCM510 (Китай), которая передавала видеоизображения с разрешением 1280x960 пикселей.

2.2.12. Визуализация бактерий с использованием сканирующей электронной микроскопии

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) культуры клеток с прикрепившимися бактериями промывали и фиксировали, как описано выше. СЭМ выполняли с использованием микроскопа Camscan S2 (Cambridge Scientific Instruments, Уитчфорд, Великобритания) в режиме визуализации вторичных электронов (SEI) с оптическим разрешением 10 нм и рабочим напряжением 20 кВ. Изображения были получены с помощью программного обеспечения MicroCapture (СМА, Москва, Россия).

2.2.13. Оценка антибиотикочувствительности

Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* Pa21, *P. aeruginosa* 1840 и *L. monocytogenes* EGDe определяли с помощью диско-диффузионного метода и метода определения минимальных ингибирующих концентраций.

Диско-диффузионный метод. Культуру бактерий, выращенную в течение 16-18 часов в жидком питательном бульоне, разводили в PBS (фосфатно-солевой буфер) до оптической плотности 1.0 (OD600), что соответствует $1-2 \times 10^9$ КОЕ/мл. Затем суспензию развели в 100 раз (до $\approx 10^7$ КОЕ/мл), откуда 100 мкл ($\approx 10^6$ КОЕ/мл) нанесли равномерно на чашку Петри диаметром 9 см, с питательным агаром. После нанесения бактериальной культуры на чашку положили диски с тестируемым веществами. Засеянные чашки инкубировали 24 часа. За это время бактерии выросли, формируя газон.

Из-за диффузии антибиотиков из диска вокруг диска сформировалась зона ингибирования роста, выглядящая как прозрачное пятно.

Метод определения минимальных ингибирующих концентраций.

Культуру бактерий, выращенную в течение 16-18 часов в жидком питательном бульоне, разводили 1:100 в стерильном бульоне, в который был добавлен гентамицин в разных разведениях. Через 24 часа измеряли оптическую плотность выросшей культуры при длине волны 595 нм.

2.2.14. Статистические методы

Все эксперименты повторялись не менее чем в трехкратной повторности. Значения среднего и стандартного отклонения (SD) рассчитывались на основе всего набора данных, где это применимо, в Excel, входящей в программное обеспечение Microsoft Office 2016. Статистический анализ проводился с использованием Т-теста, включенного в то же программное обеспечение, а также с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Допущение об однородности дисперсии проверялось с помощью теста Левена. Статистические различия считались значимыми, когда значение p составляло $<0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ¹

3.1. Разработка и валидация прототипа системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий

В ходе работы было протестировано более 20 вариантов конструкций микрофлюидической камеры и выбраны оптимальные ее параметры, позволяющие наблюдать характер движения бактерий на расстоянии 10-15 мкм как от дна канала, так и от стекла. Печать камер производилась на 3D принтере (Anycubic Photon, Китай). Это расстояние было выбрано исходя из того, что средний размер бактериальной клетки со жгутиками (на примере кишечной палочки, листерий) составляет 10 мкм. Таким образом, используя микрофлюидическую камеру с высотой слоя жидкости 30 мкм, мы могли наблюдать за траекториями движения на стадии выхода бактерии из толщи бактериальной суспензии (так называемой стадии «landing»), во время приповерхностного движения, исключив взаимодействие бактерии с поверхностью при помощи флагелл.

Разбивку полученных изображений на кадры, распознавание изображения и восстановление местоположения бактериальных клеток на кадре производили в программе Плазма 4.0. (рис.7). Последующий анализ данных, включающий покадровое определение координат для каждой бактериальной клетки и реконструкцию индивидуальных траекторий движения, производился в MATLAB R2018b (рис.8). Данная работа выполнялась совместно с сотрудниками Объединённого института высоких температур РАН. В результате подбора условий записи и анализа изображений

¹ Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора

1. Сысолятина Е. В. и др. Особенности формирования активных сред бактериями *Listeria monocytogenes* в зависимости от температуры культивирования и вязкости раствора //Вестник Объединенного института высоких температур. – 2019. – Т. 2. – №. 1. – С. 75-78.
2. Abdulkadieva M. M. et al. Strain specific motility patterns and surface adhesion of virulent and probiotic *Escherichia coli* //Scientific Reports. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 614.
3. Abdulkadieva M. M. et al. Motility provides specific adhesion patterns and improves *Listeria monocytogenes* invasion into human HEp-2 cells //Plos one. – 2023. – Т. 18. – №. 8. – С. e0290842.

подвижных частиц был создан рабочий прототип системы анализа паттернов приповерхностного движения.

Этот прототип позволяет получить такие характеристики движения, как мгновенные и средние скорости движения бактерий, распределения скоростей бактерий по модулю и направлению; среднюю длину траектории движения и время пребывания в слое, на котором сфокусирован объектив микроскопа, а также временную зависимость среднеквадратичных смещений, что является показателем активности бактериальной среды в целом.

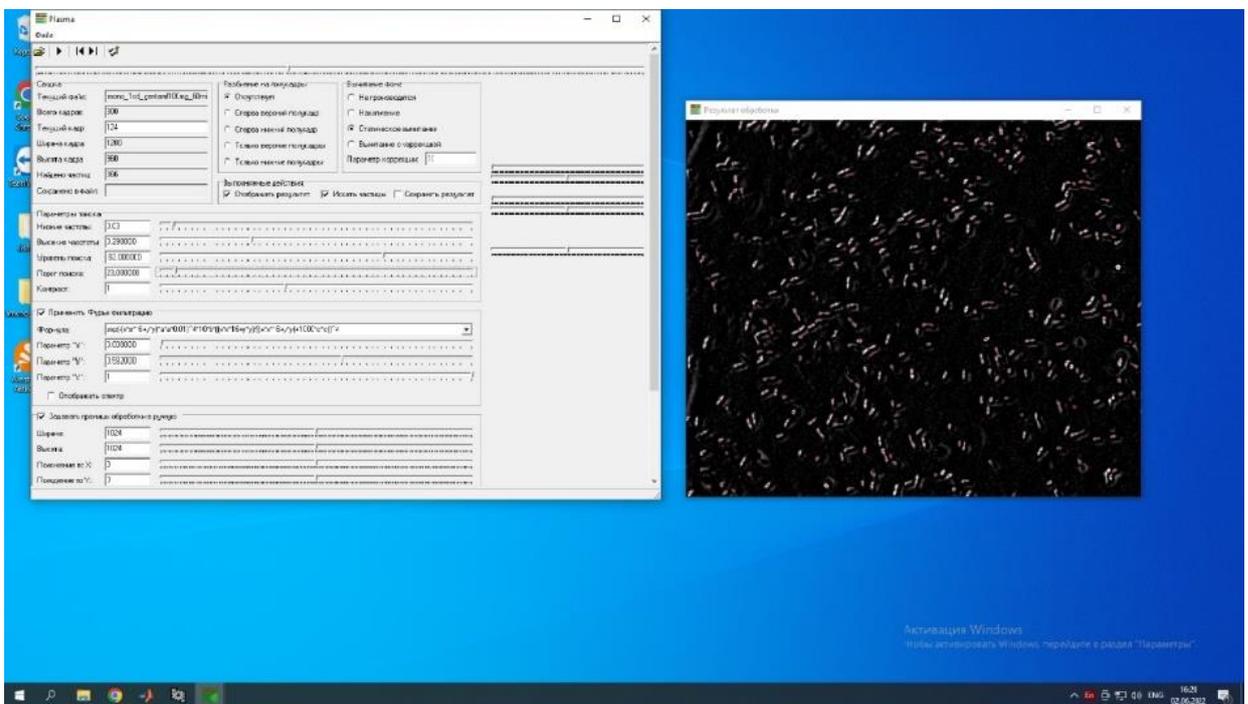


Рисунок 7. Применение программы Plasma 4.0 для восстановления траекторий движения

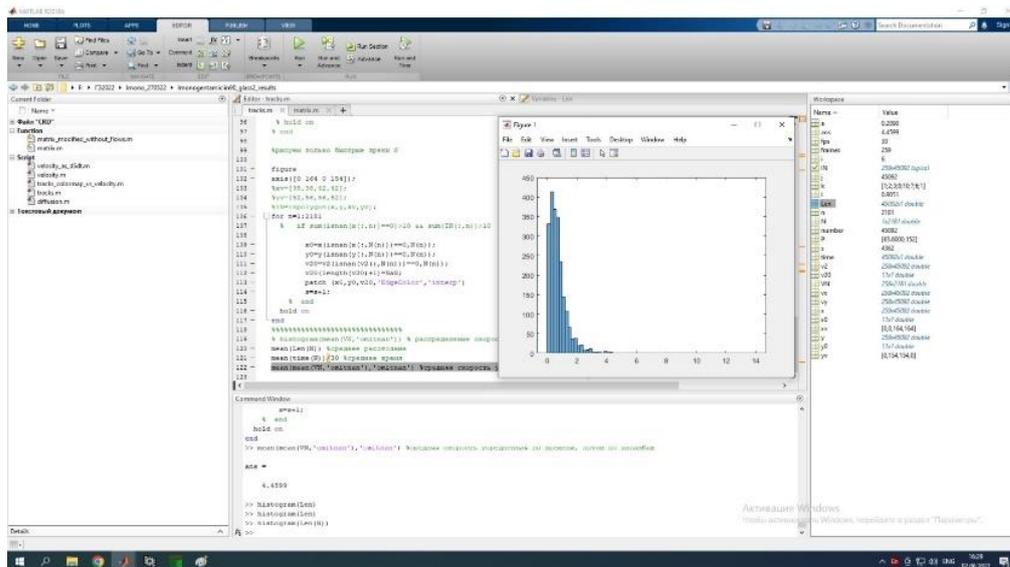


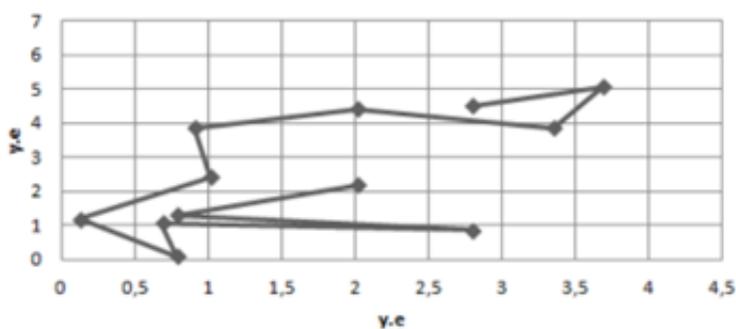
Рисунок 8. Применение программы MATLAB R2018b для математического анализа параметров движения

Для валидации прототипа необходимо было определить, насколько чувствительна разработанная система анализа изображений при изменении подвижности микроорганизмов. Известно, что на скорость движения микрочастиц влияет вязкость среды и концентрация подвижных объектов.

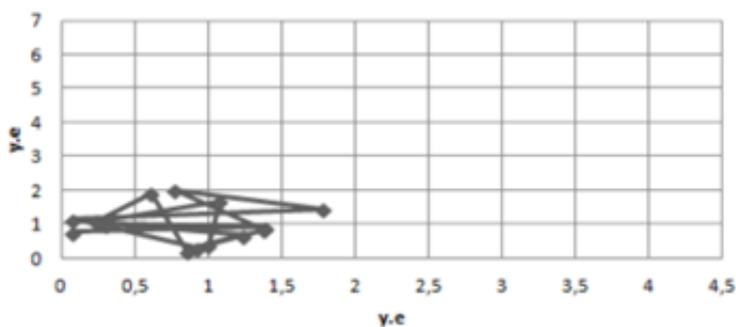
Для листерий, выращенных при температуре 25°C и 37°C, то есть подвижных и не подвижных, были определены скорости передвижения и траектории. Было установлено, что средняя скорость для имеющих жгутики листерий составила 2.05 ± 0.15 у.е./с (1 у.е. — это длина бактериальной клетки, приблизительно 1 мкм) (Таблица 1). Неподвижные листерии перемещались со скоростью 1.41 ± 0.21 у.е./с, что на 31% медленнее ($p < 0.05$). Траектории движения микроорганизмов демонстрировали, что подвижные листерии перемещались в пространстве (рис. 9, а), и их траектории подходили под описание активного Броуновского движения, характерного для частицы, имеющей начальную скорость в определенном направлении [19]. Для неподвижных листерий (выращенных при 37°C) было характерно так

называемое пассивное Броуновское движение, так как они колебались вокруг своей оси (рис. 9, б).

Полученные данные полностью согласовывались с фактом, что повышение температуры инкубации листерий до 37°C приводит к нарушению формирования ими флагелл.



(а)



(б)

Рисунок 9. Траектории движения подвижных (а) и неподвижных (б) листерий.

Таким образом, нами было установлено, что прототип системы анализа паттернов движения бактерий может дифференцировать подвижные и неподвижные микроорганизмы.

Следующим этапом работы была валидация прототипа при оценке характеристик движения бактерий в средах с разной вязкостью. Для повышения вязкости среды использовался раствор сахарозы. При комнатной температуре (25°C) 0.5М раствор сахарозы имеет вязкость $1.0556 \cdot 10^{-3}$ Па·с, а

2М раствор - $1.3445 \cdot 10^{-3}$ Па·с при показателе вязкости для воды $1.004 \cdot 10^{-3}$ Па·с [214] Расчет скорости движения подвижных листерий показал, что уже в 0.5М сахарозе наблюдалось резкое замедление перемещения бактерий с 2.05 ± 0.15 до 0.84 ± 0.05 у.е./с (без учета ламинарных течений) (табл. 3). В растворе сахарозы с концентрацией 2М показатель был аналогичным - 0.84 ± 0.1 у.е./с. В обоих случаях различия между группами являлись достоверными ($p < 0.05$), следовательно, даже незначительное повышение вязкости раствора на 0.0516 (с 1.004 до 1.0556) $\cdot 10^{-3}$ Па·с приводило к снижению скорости передвижения листерий при помощи жгутиков на 59%, а с учетом ламинарного течения - в несколько раз.

Таблица 3. Скорости движения листерий в зависимости от температуры и растворителя

Средняя скорость	Подвижные листерии (25°C)			Неподвижные листерии (37°C)		
	PBS	0.5М сахароза	2.5М сахароза	PBS	0.5М сахароза	2.5М сахароза
у.е./с	2.05 ± 0.15	0.84 ± 0.05	0.84 ± 0.10	1.41 ± 0.21	1.03 ± 0.25	1.18 ± 0.29

Для проверки гипотезы, что замедление движения может быть связано с токсическим гиперосмотическим эффектом раствора сахарозы, делали серию десятикратных разведений и высевы из используемых в работе образцов. Антибактериальный эффект при инкубации микроорганизмов в 0.5М и 2М сахарозе обнаружен не был.

Для неподвижных листерий, выращивавшихся при 37°C, различия в средней скорости перемещения в зависимости от вязкости не являлись достоверными (табл. 3). Однако при сравнении скорости передвижения листерий с флагаеллами и без них в растворах сахарозы было установлено, что кажущиеся различия в средних значениях для этих групп также недостоверны ($p > 0.05$). Таким образом, при повышении вязкости раствора листерии,

способные к передвижению при помощи жгутиков, вели себя как пассивные броуновские частицы.

Интересно, что в растворе сахарозы уже при ее концентрации 0.5М траектории движения подвижных и неподвижных листерий в целом совпали (рис. 10). При этом для листерий без жгутиков наблюдался переход от колебательных движений к более направленным, что, по-видимому, связано с наличием ламинарных течений вязкой среды, минимизировать которые на первом этапе разработки прототипа системы не удалось. В растворе сахарозы 2М наблюдалась та же картина.

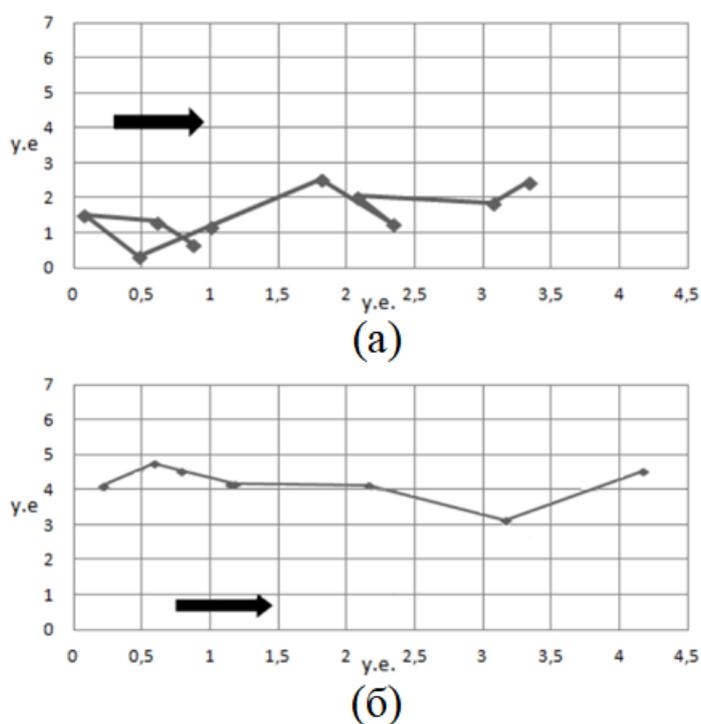


Рисунок 10. Траектории движения листерий в 0.5М сахарозе (а) подвижных и (б) неподвижных без коррекции на направление течения ламинарного потока. Стрелкой указано движение жидкости.

Таким образом, на примере листерий было показано, что изменение вязкости с $1,004$ до $1,055 \cdot 10^{-3}$ Па·с приводило к детектируемым изменениям в характеристиках движения, включая траектории.

Еще одним параметром, влияющим на подвижность микроорганизмов, является концентрация клеток. Нами было установлено, что при концентрации бактерий кишечной палочки $0,3 \times 10^9$ клеток/мл в среде PBS среднее значение их скорости составляло 3 мкм/с. При увеличении концентрации до $1,7 \times 10^9$ клеток/мл средняя скорость составила 3,7 мкм/с (рис. 11). В 1% растворе метилцеллюлозы средняя скорость движения составила 2,5 мкм/с и не менялась при варьировании концентрации бактериальных клеток в диапазоне $(0,3 - 8,5) \times 10^9$ клеток/мл. В свою очередь, для 2М раствора сахарозы наблюдалась прямо пропорциональная зависимость средней скорости движения от концентрации бактерий (Рис. 11).

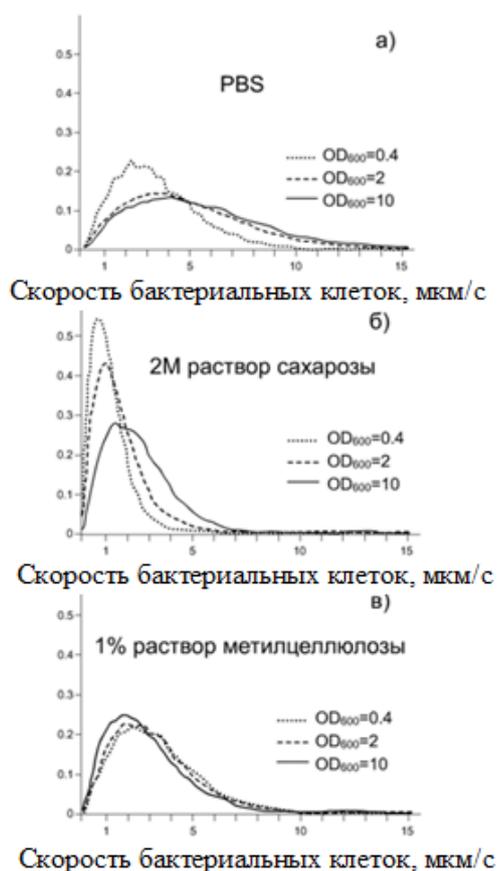


Рисунок 11. Функции распределения скоростей разных концентраций бактериальных клеток в различных средах: а) PBS; б) 2М раствор сахарозы в зависимости от концентрации бактерий, в) 1% раствор метилцеллюлозы. OD – оптическая плотность бактериальной суспензии.

Объяснением наблюдаемого явления может являться предположение, что в жидкой среде за движущейся бактерией образовывается кильватерный след – возмущенная полоса жидкости. При увеличении концентрации бактериальных клеток эффективная вязкость среды может уменьшаться до определённых пределов. В случае если бактерия выбирает стратегию двигаться в кильватерном следе другой бактерии, это будет приводить к росту средней скорости ее движения до некоторого предельного значения как это видно в PBS. В случае для 2М раствора сахарозы такого порога в средней скорости не наблюдалось, вероятно, в связи с тем, что предельное значение концентрации не было достигнуто.

Метилцеллюлоза, являясь полимером, формирует ячеистую структуру, которая демпфирует («гасит») кильватерный след, создаваемый при движении *E. coli* в такой среде. Таким образом может быть объяснена причина отсутствия влияния концентрации бактериальных клеток на их среднюю скорость движения.

В результате проведенной работы по тестированию прототипа системы анализа паттернов подвижности на штаммах *L. monocytogenes* EGDe, выращенных при 25°C, *L. monocytogenes* EGDe, выращенных при 37°C и *E. coli* M17 было установлено, что предложенная система позволяла достоверно детектировать изменения в подвижности бактерий на уровне долей микрометра (от 0,3 до 0,9) по средним скоростям. Во всех дальнейших экспериментах мы применяли этот прототип системы оценки анализа паттернов движения микроорганизмов, а впоследствии доработка математического анализа полученных траекторий позволила убрать искажения, вносимые ламинарным течением.

3.2. Анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*

Наблюдение за характеристиками и траекториями движения патогенных и сапрофитических бактерий были прослежены на моделях грамтрицательной энтерогемморагической *E. coli* ATCC43890, и пробиотического штамма *E. coli* M17, входящего в состав препарата «колибактерин». В качестве отрицательного контроля использовался малоподвижный лабораторный штамм JM109.

Бактериологический тест на подвижность в полужидком агаре не выявил различий между подвижными штаммами M17 и ATCC43890 (рис. 12). Оба штамма распространялись в полужидком агаре с одинаковой эффективностью, которая была заметно выше, чем у контрольного неподвижного штамма JM109. Области помутнения, показывающие распространение бактерий в полужидком агаре после 24 ч роста, составляли $4 \pm 0,5$ мм для JM109, что можно рассматривать как результат деления клеток. Разность в диаметрах зон мутности между M17 и ATCC43890, составляющая 51 ± 4 мм и 50 ± 2 мм соответственно, не являлась достоверной ($p > 0,05$).

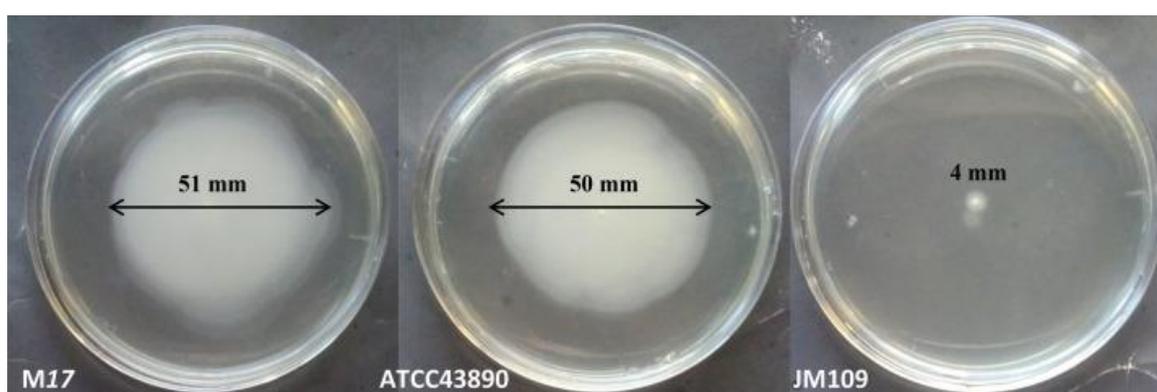


Рисунок 12. Подвижность штаммов *E. coli* в полужидком агаре.

Однако характеристики приповерхностного движения, полученные с использованием разработанной системы анализа, показывали наличие

различий между пробиотическим и патогенным штаммами *E. coli*. В то время как в PBS средние значения скорости были одинаковыми для всех трех штаммов (5,7, 6,2 и 5,5 мкм/с для JM109, M17 и ATCC43890, соответственно), другие характеристики значительно различались (табл. 4.). После расчета времени, проведенного отдельной бактерией в наблюдаемом слое жидкости (табл. 4), было установлено, что ATCC439890 продемонстрировал самое короткое время пребывания по сравнению с JM109 и M17 (0,9, 3,5 и 3,0 секунды для ATCC43890, JM109 и M17 соответственно). Эти данные, по-видимому, свидетельствовали о том, что ATCC439890 переходил от слоя к слою, перемещаясь в вертикальном направлении чаще, чем другие штаммы.

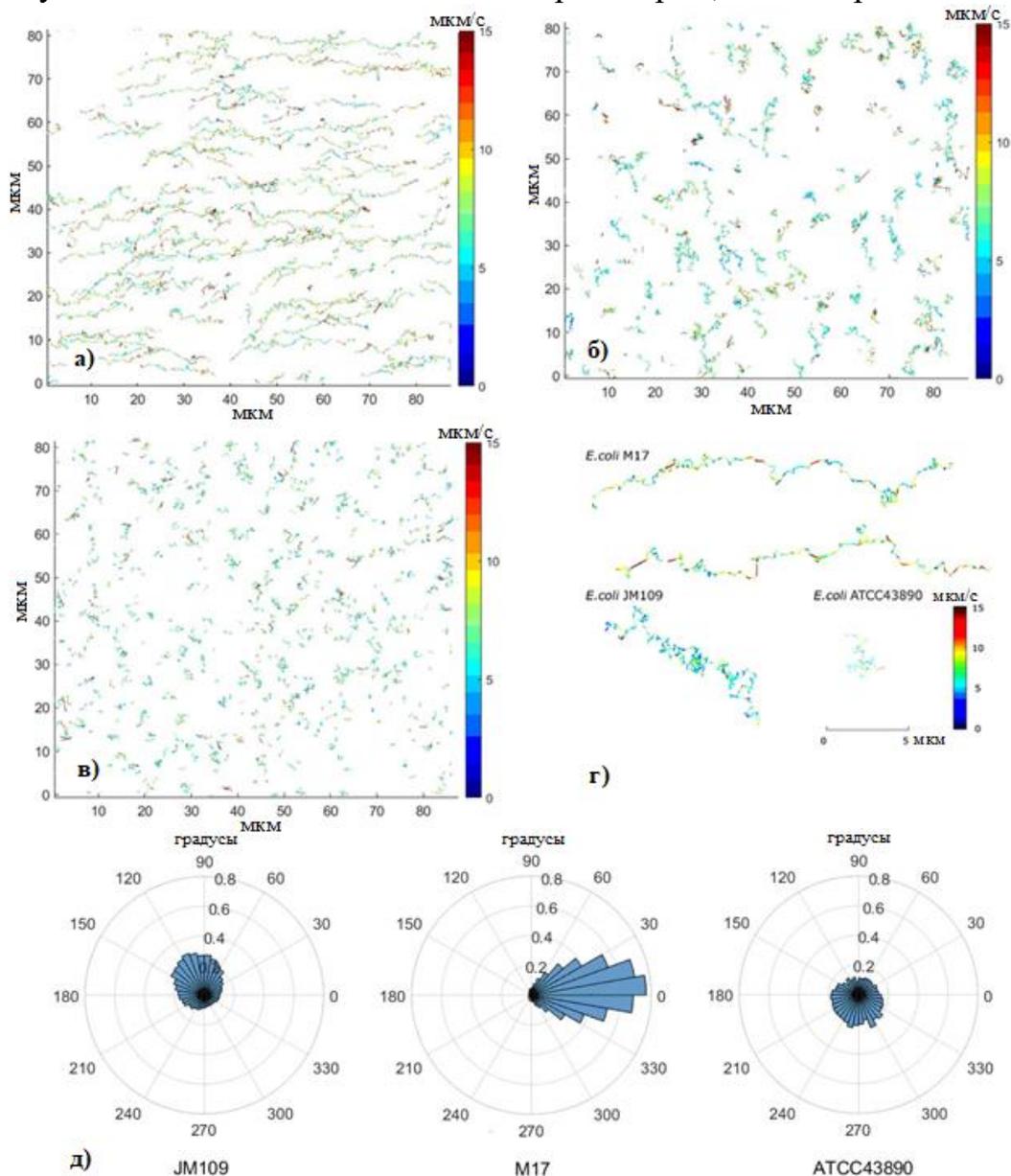
Таблица 4. Характеристики перемещения штаммов *E. coli*.

	JM109	M17	ATCC43890
Средняя скорость, мкм/с	5,7±0,5	6,2±0,5	5,5±0,5
Время пребывания в слое, с	3,5±0,3	3±0,3	0,9±0,3
Среднее расстояние, мкм	~2,6±0,3	~7±0,7	~1,4±0,1
Максимальное пройденное расстояние, мкм	10±1	30±3	3-5±0,5

Полярная гистограмма, показывающая направления движения, усредненные по всем кадрам, показывает, что для JM109 не наблюдалось направленного движения (рис. 13, д), что характерно для типичных броуновских частиц. Подвижный штамм M17 имел самые высокие значения среднего и максимального расстояний, пройденных одной бактерией, которые составляли 7 мкм и 30 мкм соответственно. Кроме того, бактерии M17 продемонстрировали направленное движение, что также отражено на полярной гистограмме (рис. 13, д). ATCC43890 имел самую короткую

среднюю траекторию 1,7 мкм и максимальное расстояние всего 5 мкм. Эти значения были в 1,5 и 2 раза меньше, чем для JM109 с броуновским движением, и в 4 и 6 раз меньше, чем для M17, соответственно.

Рисунок 13. Восстановленные траектории, закодированные цветом в



соответствии со значениями мгновенных скоростей, для разных штаммов *E. coli*: (а) M17 (б) JM109 (в) ATCC43890. (г) Типичная траектория для каждого штамма. (д) Угловые распределения векторов мгновенной скорости для каждого штамма.

В то же время траектории ATCC43890 не имели выраженного коллективного или индивидуального направленного движения и были похожи

на JM109 (рис. 13, д). Данные по средним скоростям и времени пребывания в слое не могли дать полной картины, характеризующей паттерны подвижности, поэтому следующим этапом работы была оценка возможности коллективного движения бактерий в суспензии.

3.3. Установление характеристик подвижности штаммов *E. coli* как активной среды, частицы которой имеют направленное движение

Анализ распределения направления движения бактерий показал, что направленное движение свойственно только M17 (см. рис. 13, д). Чтобы лучше понять характер движения каждого штамма, мы проанализировали поведение бактерий с помощью подходов, использующихся в теории активных сред [19]. Бактериальную суспензию в физиологическом растворе или в жидкой питательной среде можно рассматривать как активную среду, т. е. систему, состоящую из активных частиц, способных преобразовывать химическую энергию в направленное движение.

Анализ с точки зрения теории активных сред основан на расчете зависимости среднего квадратичного смещения (MSD) от времени (t). Этот метод выявляет преобладающие закономерности движения, варьирующиеся от обычного броуновского (хаотического) движения до баллистического режима. Расчет зависимости MSD от времени для слабоподвижного JM109 выявил линейную зависимость MSD от времени. Такая зависимость MSD(t) характерна для движения пассивных частиц, сталкивающихся с молекулами среды, что характерно для классической броуновской динамики [66]. Для M17 среднеквадратичное смещение MSD было пропорционально времени в степени 1,5 ($MSD \sim t^{1,5}$). Такая зависимость явно указывает на супердиффузию [19]. Супердиффузия означает, что направленное движение в горизонтальной плоскости преобладает над хаотической составляющей движения, и бактерии M17 можно классифицировать как активные броуновские частицы. Эти данные согласуются с прямым вычислением вектора направления средней скорости.

Асимптотика (математическое поведение функции в особых точках, чаще всего при стремлении аргумента или функции к бесконечности) для ATCC43890 оказалась равной $MSD \sim t^{0,8}$, то есть бактерии двигались в субдиффузионном режиме. Однако нужно отметить, что эксперимент был ограничен наблюдением за бактериями в горизонтальном слое толщиной ~ 5 мкм, в то время как общая высота микрофлюидной камеры составляла 30 мкм, т. е. субдиффузионный режим может объясняться тем, что бактерии вышли из поля зрения. Другими словами, мы можем судить только о горизонтальной компоненте скорости, в то время как бактерии перемещались в трехмерной среде, и субдиффузионное движение бактерий в горизонтальном направлении могло быть компенсировано супердиффузией в вертикальном направлении. Предположение о преимущественном перемещении бактерий ATCC43890 в вертикальном направлении подтверждается небольшими расстояниями и коротким временем пребывания в горизонтальном слое (рис. 14).

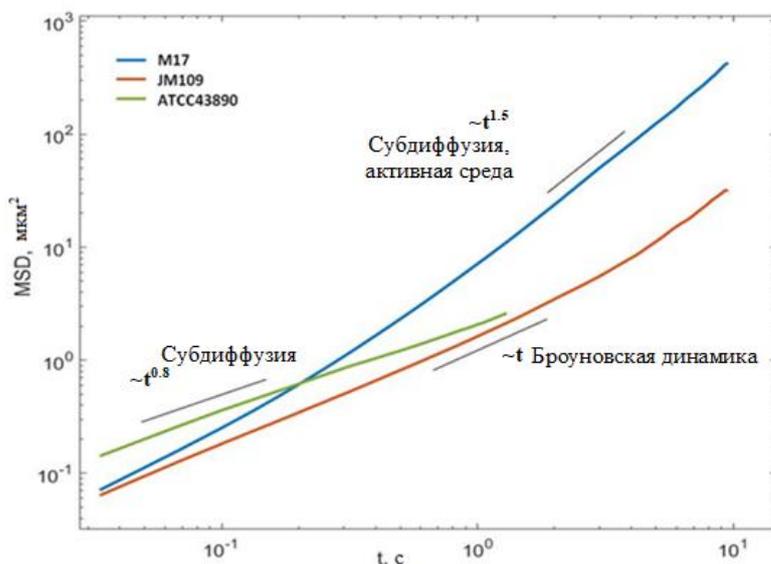


Рисунок 14. Логарифмическая зависимость среднеквадратичного смещения (MSD) от времени для различных штаммов *E. coli*.

Таким образом, выполненный анализ подтвердил сформулированный ранее вывод об индивидуальном характере движения исследуемых штаммов *E. coli*. JM109 демонстрировал в основном броуновское движение, M17

двигался коллективно, преимущественно в горизонтальном направлении, в то время как ATCC43890, скорее всего, преимущественно перемещался вертикально. Принимая во внимание эти заметные различия в характере движения и его направленности, мы изучили, как эти микроскопические характеристики будут влиять на такой макроскопический параметр, как адгезия.

3.4. Характеристика эффективности адгезии к пластику подвижных и неподвижных штаммов *E. coli*

Мы сравнили эффективность адгезии бактерий к горизонтальным поверхностям для трех изученных штаммов. Эффективность адгезии к абиотической поверхности была оценена в 24-луночной планшете из полиэтилентерефталата. Через 15 мин малоподвижный JM109 показал самую низкую скорость адгезии ($0,14 \pm 0,04\%$ от первоначально добавленных бактерий), но увеличение экспозиции до 60 мин повысило эффективность его адгезии в $6,3 \pm 2,1$ раза. Подвижные штаммы продемонстрировали более эффективную быструю адгезию $2,71 \pm 0,2\%$ и $0,32 \pm 0,07\%$ для M17 и ATCC43890, соответственно, через 15 минут. Однако динамика адгезии подвижных штаммов была совершенно иной по сравнению с JM109. После 60-минутной инкубации абсолютное количество прикрепленных бактерий M17 просто удвоилось и достигло $5,12 \pm 0,56\%$ от первоначально добавленных. Для ATCC43890 увеличение времени инкубации до 30 мин привело к трехкратному уменьшению числа прикрепленных клеток с $0,32\%$ до $0,1\%$ ($p < 0,05$), а 60-минутная инкубация привела к повышению эффективности адгезии на $0,52\%$, что было самым низким показателем для трех штаммов и в 1,7 раза ниже, чем для малоподвижного штамма JM109 (рис. 15).

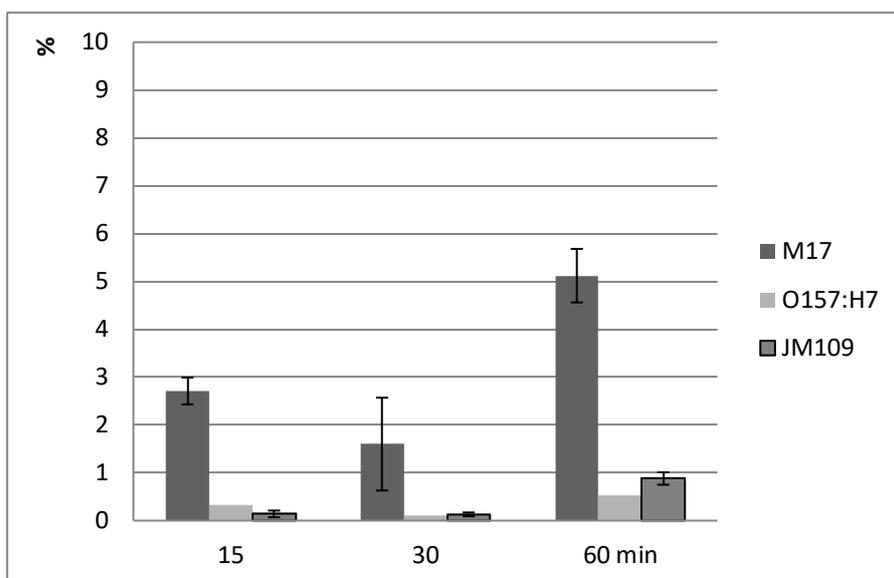


Рисунок 15. Скорость адгезии к пластику у различных штаммов *E. coli*.

Таким образом, адгезия, по-видимому, являлась динамическим процессом для подвижных бактерий и результатом пассивного оседания в случае со слабоподвижным штаммом.

3.5. Оценка влияния подвижности *E. coli* на эффективность адгезии к клеткам человека линии HEp-2

Как M17, так и ATCC43890 могут колонизировать кишечник, поскольку первый является пробиотическим, а второй - патогенным. Чтобы проанализировать, влияют ли наблюдаемые различия в характере подвижности на бактериальные взаимодействия с эпителиальными клетками, мы использовали линию эпидермоидной карциномы гортани человека HEp-2. Эти клетки имеют рецепторы ламинина и фибронектина, которые являются специфическими мишенями для геморрагического штамма *E. coli* ATCC43890 [129].

Через 15 минут инкубации для JM109 и M17 эффективность адгезии была сопоставима с адгезией на пластике ($0,27 \pm 0,11\%$ и $5,79 \pm 1,56\%$ для JM109 и M17 соответственно). Однако эффективность адгезии ATCC 43890 к клеткам

HEp-2 была ниже, чем к пластику ($0,13 \pm 0,03\%$ и $0,32 \pm 0,07\%$ для HEp-2 и пластику через 15 минут после добавления бактерий, соответственно). Инкубация в течение 60 минут привела к увеличению количества адгезировавшихся бактерий JM109 в 9,2 раза по сравнению с первыми 15 минутами. Напротив, длительная 60-минутная инкубация почти не увеличивала количество адгезировавшихся бактерий M17 и ATCC438990 (увеличение в 1,07 и 1,5 раза соответственно), (рис. 16).

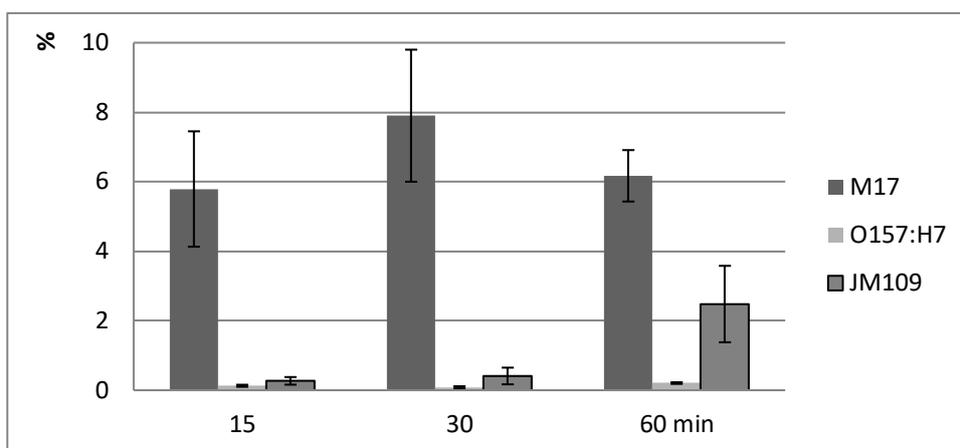


Рисунок 16. Скорость адгезии к клеткам HEp-2 у различных штаммов

E. coli

Полученные результаты позволили предположить, что повышение эффективности адгезии неподвижного штамма *E. coli* JM109 после 60 минут инкубации было в основном обусловлено осаждением бактерий под действием силы тяжести. Отсутствие положительной динамики для подвижных штаммов может свидетельствовать о том, что процент бактерий, способных к адгезии на эукариотических клетках, ограничен. Другим объяснением может быть ограниченная доступность рецепторов, в результате чего за 15 мин инкубации доступные к взаимодействию рецепторы были преимущественно заняты. Разница в динамике адгезии к пластику и к клеткам HEp-2 подтверждает второе предположение: в то время как количество бактерий M17 и ATCC43890, адгезировавшихся к пластику, увеличилось с 15 до 60 минут, при взаимодействии с клетками HEp-2 этого не наблюдалось.

3.6. Анализ рисунков адгезии патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*

Для того чтобы понять, с чем связаны разные уровни адгезии, мы сравнили рисунки адгезии на пластике и на клетках для разных штаммов. Для получения рисунков адгезии были сделаны микрофотографии бактерий, прикрепившихся к пластику и клеткам HEp-2 через 15 минут инкубации. Для этого бактерии адгезировавшие на пластике, и клетки HEp-2 окрашивали Hoechst 33342 (ThermoFisher, США).

Малоподвижный JM109 прикреплялся к пластику и поверхности клеток HEp-2 в виде небольших автоагрегатов, что предполагало начальную флокуляцию и соответствует нашему предположению о его пассивном осаждении (рис. 17, а, г). Для M17 было характерно неравномерное распределение по пластику с формированием линейных кластеров из 3–5 или более бактериальных клеток (рис. 17, б). При взаимодействии с клетками HEp-2 бактерии M17 концентрировались преимущественно на границе между соседними клетками, формируя группы из более чем 10 бактерий с той же линейной геометрией, что и на поверхности пластика (рис. 17, д). Напротив, ATCC43890 имели совершенно другой рисунок адгезии. На пластике они располагались одиночно или формировали группы из двух бактерий, а на поверхности эукариотических клеток обнаруживались равномерно расположенные изолированные бактерии и не наблюдалось никакого тропизма к областям контакта соседних клеток (рис. 17, в). Количество *E. coli* ATCC43890, которое адгезировалось к клеткам, было выше, чем для JM109, что противоречило результатам предыдущего эксперимента, по количественной оценке, эффективности адгезии. Это несоответствие может быть связано со слабой адгезионной прочностью штамма ATCC43890 и/или более мягкой отмывкой образцов для изготовления микрофотографий.

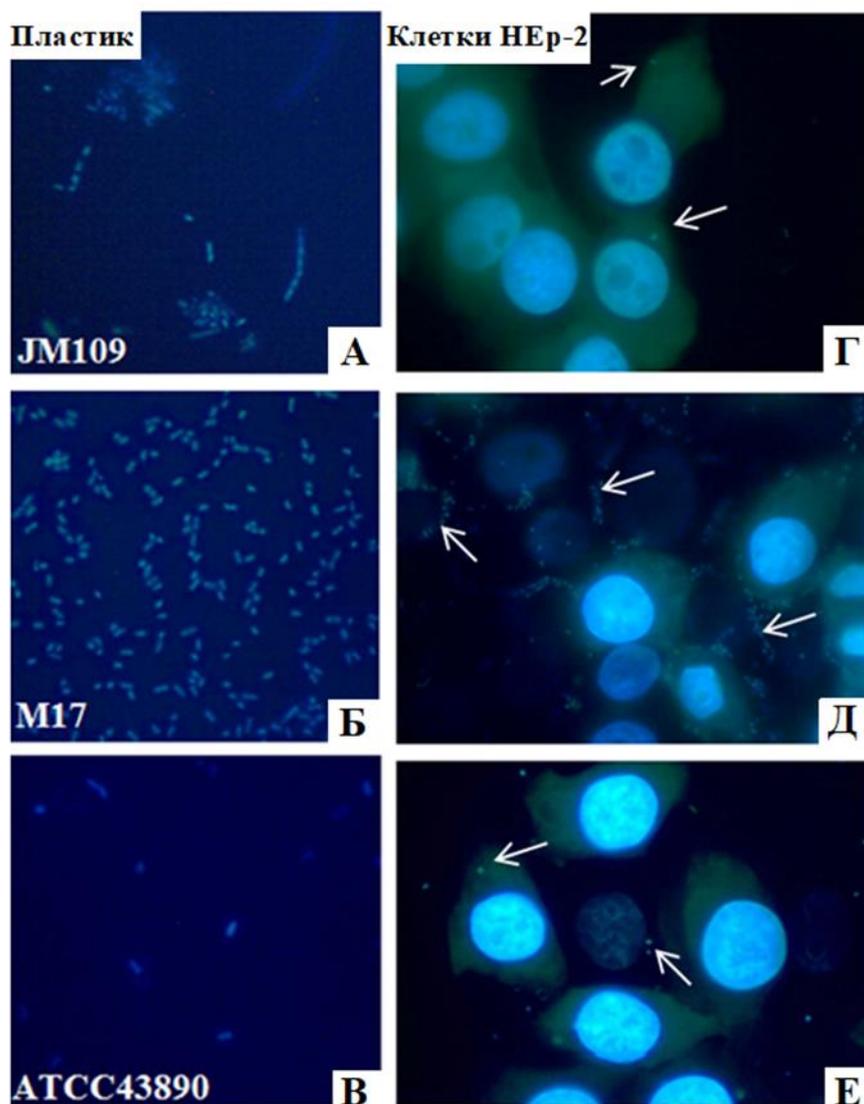


Рисунок 17. Микрофотографии адгезировавшихся штаммов кишечной палочки. Стрелками показаны адгезировавшиеся бактерии в определенных зонах поверхности клеток.

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно предположить, что могут существовать две модели подвижности бактерий, обеспечивающих более эффективную адгезию: модель горизонтального и вертикального перемещения на этапе выхода бактерии из толщи суспензии («лэндинга», «landing»). Горизонтальное перемещение, характеризующееся коллективным направленным перемещением микроорганизмов внутри горизонтального слоя, может обеспечить более эффективную

неспецифическую колонизацию поверхности. Движение в вертикальном направлении может способствовать более быстрому переходу от объемного к приповерхностному перемещению, что позволяет микроорганизмам "протестировать" поверхность и повысить вероятность взаимодействия с рецепторами. Таким образом, индивидуальные различия в моделях подвижности могут лежать в основе различных стратегий адгезии. Данные, полученные в ходе выполнения работы, являются новыми и ранее в мировой литературе не описаны.

Второй большой задачей было установление характеристик подвижности разных видов листерий, патогенных и непатогенных, и вклада подвижности в способность к адгезии и инвазии в эукариотические клетки. В целом методы и подходы, используемые на этом этапе работы, не отличались от используемых ранее.

3.7. Анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *Listeria spp.*

Полученные данные по *E. coli* позволили приступить к установлению связи паттернов приповерхностного движения с эффективностью адгезии и инвазии патогенных и непатогенных для человека видов листерий. В схему эксперимента при этом добавлялся один этап – оценка инвазии, то есть внедрения листерий в эукариотические клетки.

Наблюдение за характеристиками и траекториями движения патогенных и условно патогенных бактерий были прослежены на моделях грамположительных бактерий рода *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*).

Мы проанализировали паттерны приповерхностного движения патогенных и сапрофитических видов листерий. В качестве контроля использовали неподвижных листерий, которых инкубировали при 37°C (рис.19). В целом листерии имели более высокие скорости движения, в диапазоне от 17 до 27 мкм/с, чем кишечная палочка. Наибольшую среднюю

скорость развивали *L. ivanovii* – 27 мкм/с. Среди патогенных *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* наблюдалось значительное количество «быстрых» бактерий с мгновенными скоростями до 100 мкм/с (рис. 18). Однако ни для одного вида не наблюдалось коллективное движение, характерное для штамма *E. coli* M17, и время пребывания бактерий в слое также не различалось.

Патогенные и условно патогенные виды листерий имели одинаковые характеристики и траектории движения в физиологических условиях. В PBS средние значения скорости были близкими для всех видов листерии (20, 17, 27, 25 мкм/с для *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*, соответственно). Однако для *L. monocytogenes* подвижность значительно изменилась при изменении температуры инкубации с 25 на 37°C. При 37°C бактерии продемонстрировали типичное броуновское движение со средним расстоянием, пройденным одной бактерией в пределах горизонтального слоя жидкости, равным 6,4 мкм (табл. 5.). При 25°C *L. monocytogenes* имели самые высокие значения средних расстояний, пройденных одной бактерией - 10 мкм.

Таблица 5. Характеристики подвижности листерий разных видов

Параметры	<i>L. monocytogenes</i> 37°C	<i>L. monocytogenes</i> 25°C	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>
Средняя скорость	~12 мкм/с	20 мкм/с	17 мкм/с	~27 мкм/с	~25 мкм/с
Среднее время пребывания в слое	2,3 с	0,8 с	0,9 с	0,6 с	0,7 с
Среднее расстояние	6,4 мкм	10 мкм	7,8 мкм	9 мкм	8,4 мкм

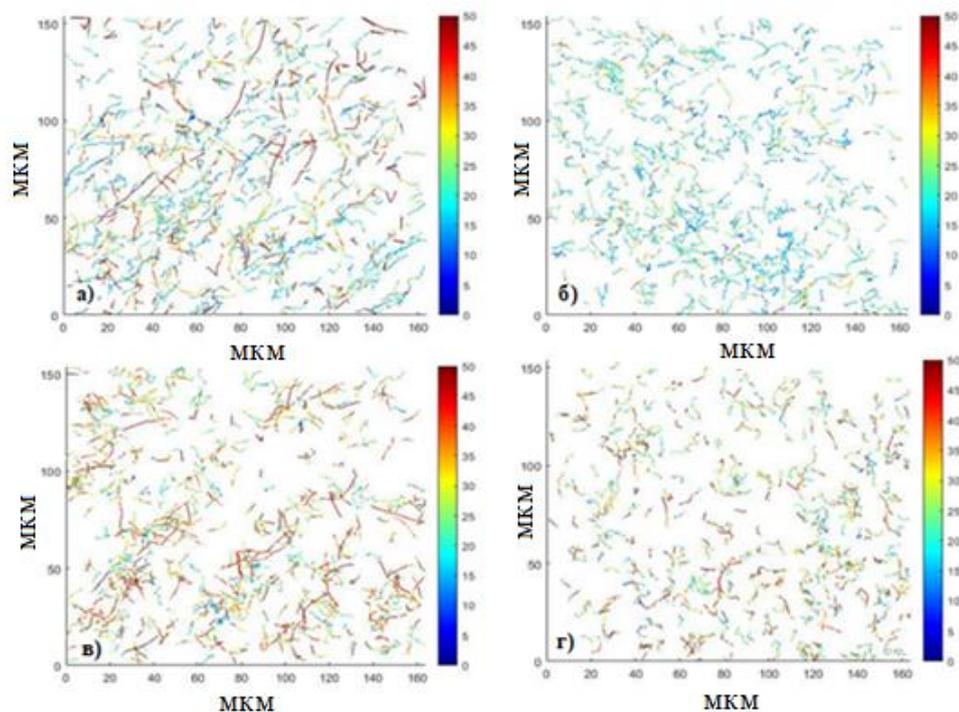


Рисунок 18. Восстановленные траектории, закодированные цветом в соответствии со значениями мгновенных скоростей, для разных видов листерии: (а) *L. monocytogenes* (б) *L. innocua* (в) *L. ivanovii* (г) *L. seeligeri*

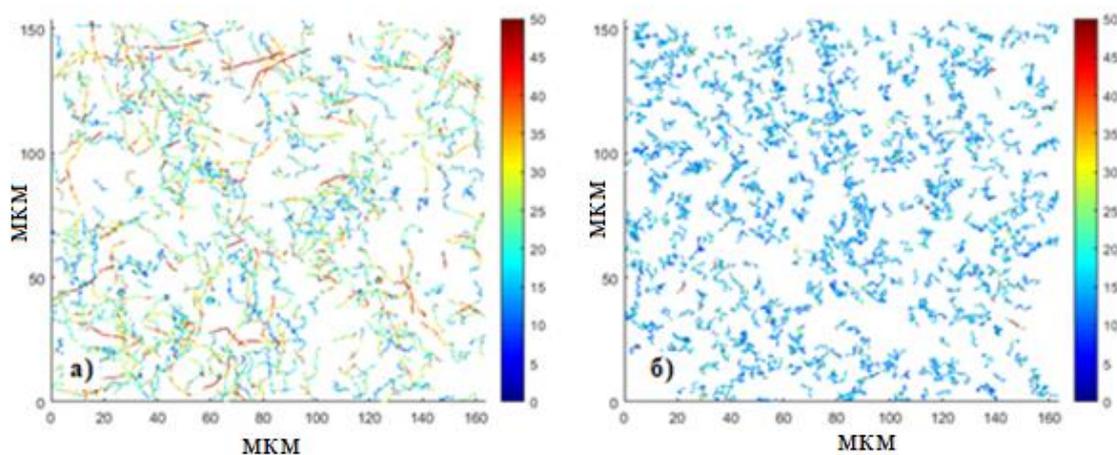


Рисунок 19. Восстановленные траектории, закодированные цветом в соответствии со значениями мгновенных скоростей, для (а) *L. monocytogenes* и (б) *L. monocytogenes* при различном температурном диапазоне: 25 и 37°C

3.8. Анализ профилей скоростей *L. monocytogenes* и *L. innocua* на стадии приповерхностного движения.

Затем мы сравнили характер подвижности двух видов *Listeria*: патогенного вида *L. monocytogenes*, штамма EGDe и сапрофитического вида *L. innocua*, штамма SLCC 3379. *L. innocua* выращивали при 22°C. *L. monocytogenes* инкубировали при 22°C и 37°C. Выращенные при 22°C *L. monocytogenes* были подвижными, а при 37°C - неподвижными, что согласуется с температурозависимой регуляцией подвижности *L. monocytogenes* [101, 116].

Подвижность бактерий анализировали на стадии приповерхностного движения. Основные характеристики отражены на рис. 20, включая отдельные мгновенные скорости; характерные расстояния, представляющие длины бактериальных путей, которые рассчитывались как большие диагонали многоугольников, описанных вокруг бактериальных траекторий (рис. 20, Б); время пребывания, т.е. время, в течение которого отдельная бактерия оставалась в горизонтальном слое (поле зрения микроскопа) перед выходом из фокуса (рис. 20, В), и средние квадратичные смещения (MSD) во времени (t) (рис. 20, Г).

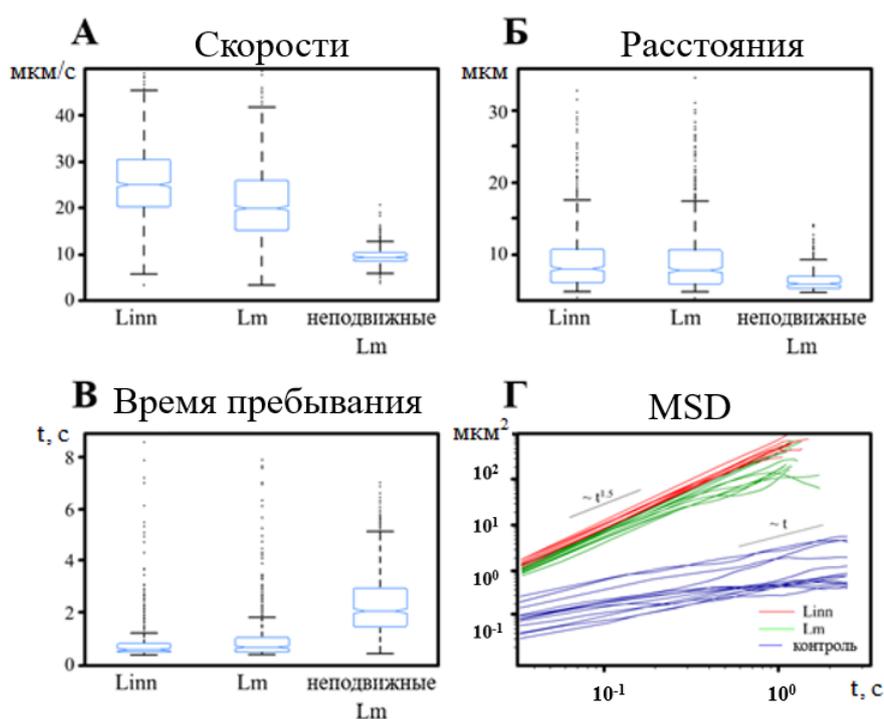


Рисунок 20. Характеристики подвижности бактерий на стадии приповерхностного движения. (А) – скорости бактерий, (Б) – характерные расстояния, представляющие длины траекторий бактерий, (В) – время пребывания в слое; (Г) – временная зависимость среднеквадратичных смещений. Подвижные *L. monocytogenes*, выращенные при 22°C; неподвижные *L. monocytogenes*, выращенные при 37°C; *L. innocua*, выращенные при 22°C.

Медианные скорости подвижных бактерий составили 20 мкм/с (доверительный интервал (ДИ) 95 19,6–20,4) и 25 мкм/с (ДИ 95 24,8–25,5) для *L. monocytogenes* и *L. innocua* соответственно, что более чем в два раза превышало медианную скорость в контроле. В качестве контроля, представляющего собой бактерий с броуновским движением, использовали суспензию неподвижных *L. monocytogenes*. Их медианная скорость составила 9 мкм/с (СИ95 8,8–9,2) ($p < 0,01$) (рис. 20, А). Среднее время пребывания в слое подвижных *L. monocytogenes* и *L. innocua* было одинаковым (0,62 с (ДИ 95 0,6–0,65) и 0,53 с (ДИ 95 0,52–0,54) соответственно) и более чем в три раза короче, чем время пребывания в слое неподвижного *L. monocytogenes* (2 с (ДИ 95 1,9–2,1); $p < 0,01$). Средние расстояния, то есть расстояния, которые отдельные бактерии преодолевали внутри слоя перед тем, как покинуть его, были немного больше для подвижных, чем для неподвижных бактерий (8 мкм (ДИ 95 7,8–8,2); 8,1 мкм (ДИ 95 8–8,4); и 6 мкм (ДИ 95 5,9–6,1) для подвижных *L. monocytogenes*, *L. innocua* и неподвижных *L. monocytogenes* соответственно; $p < 0,01$). Отдельные траектории подвижных бактерий были относительно линейными по сравнению с индивидуальными траекториями неподвижных *L. monocytogenes*. В совокупности эти данные показали, что средние параметры подвижности у подвижных бактерий патогенных и сапрофитических видов сходны, а у подвижных и неподвижных бактерий различны.

Распределение профилей скоростей подвижных бактерий носило нормальный (гауссовский) характер (*L. innocua*) или было близко к

нормальному распределению (*L. monocytogenes*) (рис. 21А). Профиль скорости неподвижных *L. monocytogenes* отклонялся от нормального распределения за счет заметного преобладания бактерий со скоростями от 0 до 7 мкм/с, что соответствует отсутствию активной подвижности. Распределение мгновенных направлений скорости было симметричным для неподвижных *L. monocytogenes* и асимметричным для подвижных бактерий (рис. 21Б). Такая асимметрия предполагает скоординированную подвижность отдельных клеток [90].

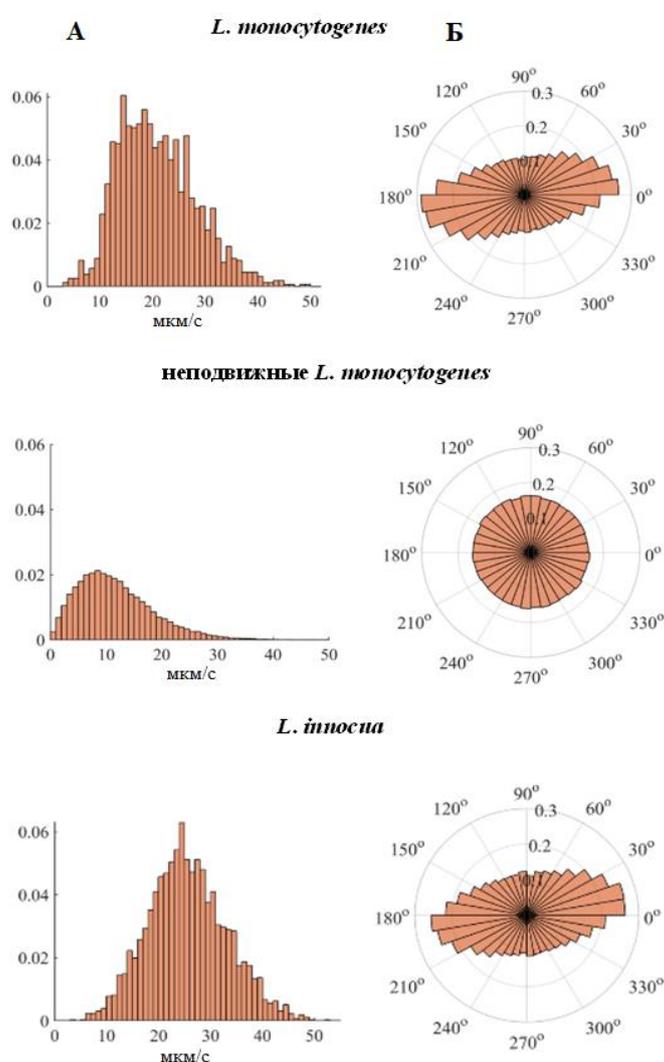


Рисунок 21. Распределение мгновенных скоростей по модулю (А) и направлению (Б).

Для дальнейшей характеристики подвижности бактерий и подтверждения предположения о преобладании направленного типа

подвижности над хаотичной составляющей мы рассчитали зависимость среднеквадратического смещения (СКО) от времени (t). Для суспензии неподвижных *L. monocytogenes* была обнаружена типичная для классической броуновской динамики линейная зависимость MSD от времени (рис. 20, Г). Для подвижных *L. monocytogenes* и *L. innocua* смещение MSD было пропорционально затраченному времени в степени 1,5 ($\sim t^{1,5}$), что указывает на активное движение в горизонтальной плоскости.

В совокупности полученные результаты показали, что патогенные и сапрофитные виды *Listeria spp* демонстрировали сходные паттерны подвижности, которые отличались от паттернов, демонстрируемых контрольной культурой неподвижных *L. monocytogenes*.

3.9. Оценка эффективности адгезии подвижных *Listeria spp*.

С помощью световой микроскопии мы проанализировали картину адгезии неподвижных и подвижных *Listeria spp* на ранних стадиях взаимодействия с поверхностью, через 15 и 60 минут после нанесения бактериальной суспензии в 24-луночный планшет (рис. 22). Через 15 минут подвижные бактерии обоих видов прикрепились преимущественно в виде случайно распределенных одиночных клеток. Характер адгезии подвижных патогенных и сапрофитных видов *Listeria* был очень схожим через 15 и 60 минут, что позволяет предположить, что характер адгезии, обусловленный подвижностью, не зависит от вирулентности. Неподвижные бактерии часто образовывали небольшие агрегаты, включающие до 10 клеток. Короткое время наблюдения не позволяли клеткам делиться, поэтому эти группы могли возникнуть скорее в результате седиментации флоккул, образовавшихся в объеме жидкости. Принимая во внимание все вышеизложенное, можно предположить, что подвижность препятствовала флокуляции бактерий в объеме жидкости.

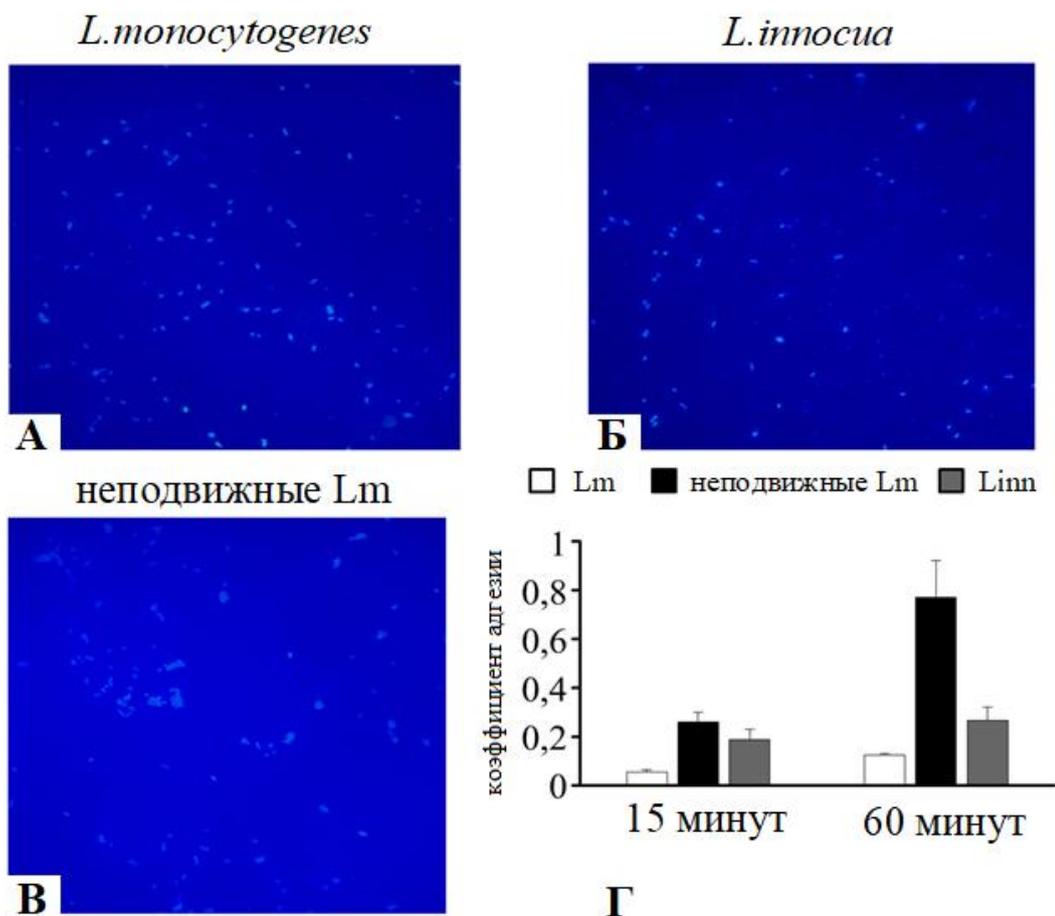


Рисунок 22. Адгезия к поверхности пластика. Иллюстрация типичных рисунков бактериальной адгезии *L. monocytogenes* (А), *L. innocua* (Б) и неподвижного *L. monocytogenes* (В) соответственно. (Г) – эффективность адгезии.

Для количественной оценки эффективности адгезии были рассчитаны коэффициенты адгезии, то есть отношение бактерий, адгезировавших на пластиковой поверхности, к бактериям, добавленным в лунку (рис. 22, Г). Через 15 минут инкубации коэффициент адгезии подвижных *L. monocytogenes* был, как минимум, в 4,5 раза меньше, чем неподвижных *L. monocytogenes* ($p < 0,05$). Эффективность адгезии *L. innocua* и неподвижных *L. nonmonocytogenes* различалась незначительно ($p = 0,42$). При продлении времени инкубации до 60 минут коэффициенты адгезии увеличивались для всех протестированных

бактерий, причем наибольший прирост наблюдался для неподвижных *L. monocytogenes*. Разница между неподвижными и подвижными бактериями увеличивалась до 6,2 и 2,9 раза для подвижных *L. monocytogenes* и *L. innocua* соответственно ($p < 0,05$ для всех). Таким образом, подвижные виды *Listeria* продемонстрировали сходные закономерности адгезии, особенно на ранних стадиях наблюдения, тогда как эффективность адгезии была индивидуальной.

3.10. Распределение подвижных и неподвижных бактерий *Listeria spp* на поверхности клеток HEp-2.

Следующим вопросом, который мы рассмотрели, были закономерности бактериальной адгезии к поверхности эпителиальных клеток HEp-2 аденокарциномы гортани человека. Неподвижные *L. monocytogenes* были распределены случайным образом по поверхности клеточного монослоя, включая область над ядрами (рис. 23). Наблюдались бесформенные агрегаты, аналогичные агрегатам на поверхности пластика, что позволяет предположить такое же гравитационно-стимулированное осаждение флокул, образованных неподвижными бактериями в объеме жидкости. Напротив, как подвижные *L. monocytogenes*, так и *L. innocua* преимущественно располагались на периферии клетки. Разница в количестве *L. monocytogenes* и *L. innocua*, прикрепившихся к поверхности клеток, была менее выражена, чем в случае с адгезией на пластик (рис. 23Б). Чтобы подтвердить визуальное впечатление о неравномерном распределении бактерий, рассчитывали распределение бактерий относительно ядра клетки. Количественные данные подтвердили предположение о неравномерном распределении бактерий. В частности, часть неподвижных бактерий располагалась над ядром или непосредственно рядом с ядром (рис. 23В). Число подвижных бактерий в непосредственной близости от ядра было незначительным. Процент бактерий на периферии клетки был выше у подвижных бактерий по сравнению с неподвижными.

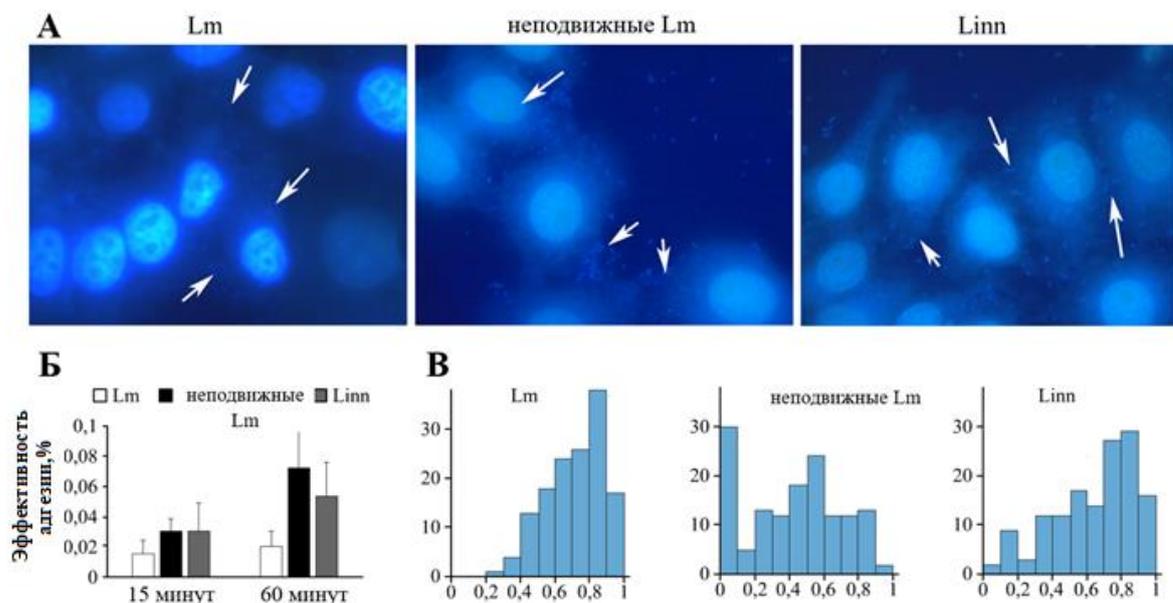


Рисунок 23. Адгезия к поверхности эпителиальных клеток HEp-2. (А) – характер адгезии *L. monocytogenes*, неподвижного *L. monocytogenes* и *L. innosua* к клеткам HEp-2 через 60 минут инкубации; белые стрелки указывают положение бактериальных клеток. (Б) – эффективность адгезии выражается в процентах прикрепившихся бактерий к количеству добавленных бактерий. (В) - распределение бактерий относительно клеточного ядра

Чтобы получить более четкие данные о распределении бактерий по поверхности клеток, мы использовали сканирующую электронную микроскопию (СЭМ). СЭМ подтвердила предположение об относительно равномерном распределении неподвижных бактерий, которые часто были представлены небольшими флоккулами на поверхности клетки, включая области над ядром (рис. 24). Подвижные бактерии как патогенных, так и сапрофитических видов были менее многочисленными, а их распределение было неравномерным: они скапливались на периферии клеток в области межклеточных границ.

L. innocua

неподвижные *L. monocytogenes*

L. monocytogenes

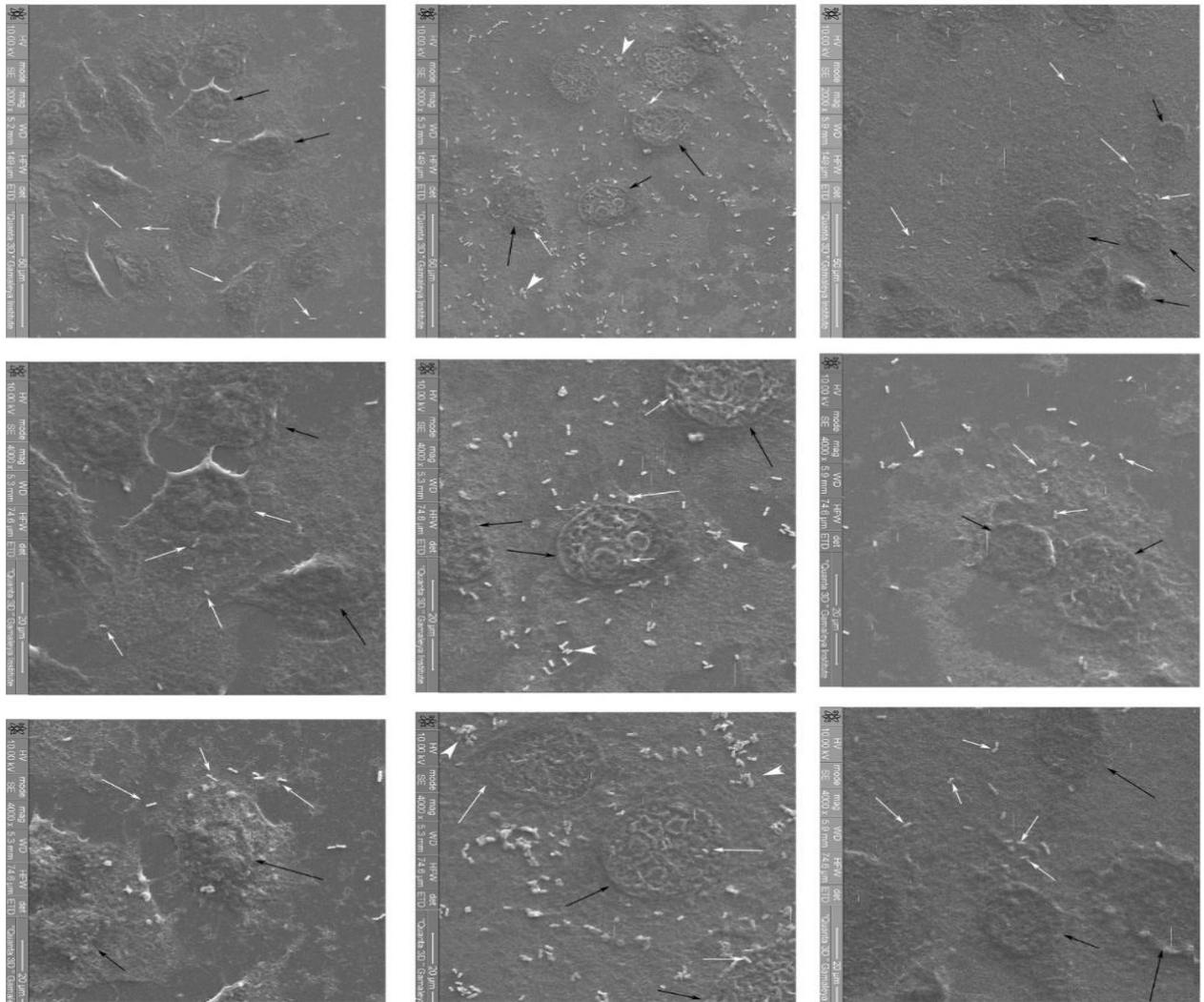


Рисунок 24. СЭМ-анализ адгезии к поверхности клеток HEp-2. Черные стрелки – ядра, а стрелки – бактерии. Белые наконечники стрел – бактериальные агрегаты.

3.11. Оценка инвазии подвижных и неподвижных *L. monocytogenes*

Для *L. monocytogenes* как факультативного внутриклеточного паразита важно, чтобы адгезия приводила к инвазии. Мы сравнивали инвазию

неподвижных и подвижных *L. monocytogenes* в клетки HEp-2, используя классический гентамициновый тест. Гентамицин добавляли к культуре эукариотических клеток через 15 и 60 минут после внесения бактерий, чтобы оставить в живых только те микроорганизмы, которые успели проникнуть внутрь эукариотических клеток. Через 15 минут инкубации эффективность инвазии неподвижных и подвижных *L. monocytogenes* была низкой и достоверно не различалась ($2,0 \times 10^{-5}\%$ и $5,9 \times 10^{-5}\%$ соответственно; рис. 25, А). Однако после 60-минутной инкубации инвазия неподвижных бактерий была почти в 10 раз эффективнее, чем подвижных ($0,001\%$ и $0,0001\%$ соответственно; $p < 0,01$).

Мы предположили, что низкая эффективность инвазии подвижных *L. monocytogenes* может быть обусловлена репрессией регулона вирулентности у бактерий, выращенных при температуре окружающей среды. Для увеличения экспрессии факторов инвазии InlA и InlB, необходимых для проникновения листерий в эпителиальные клетки, мы изменяли температуру инкубации подвижной культуры *L. monocytogenes* с 25 на 37°C на два часа, после чего использовали эту бактериальную культуру для оценки инвазии. Усиление экспрессии факторов инвазии в культуре, инкубировавшейся при температуре 37°C, контролировали по продукции InlB на поверхности бактерий. Перевод подвижной культуры *L. monocytogenes*, выращенной при 22°C, на 37°C привел к появлению на поверхности листерий InlB в количестве, сравнимом с неподвижным *L. monocytogenes*, выращенным при 37°C в течение ночи (рис.25, Б). Этот эффект наблюдался уже через 2 часа после повышения температуры инкубации, и дальнейшая инкубация подвижного *L. monocytogenes* не улучшала презентацию InlB на поверхности.

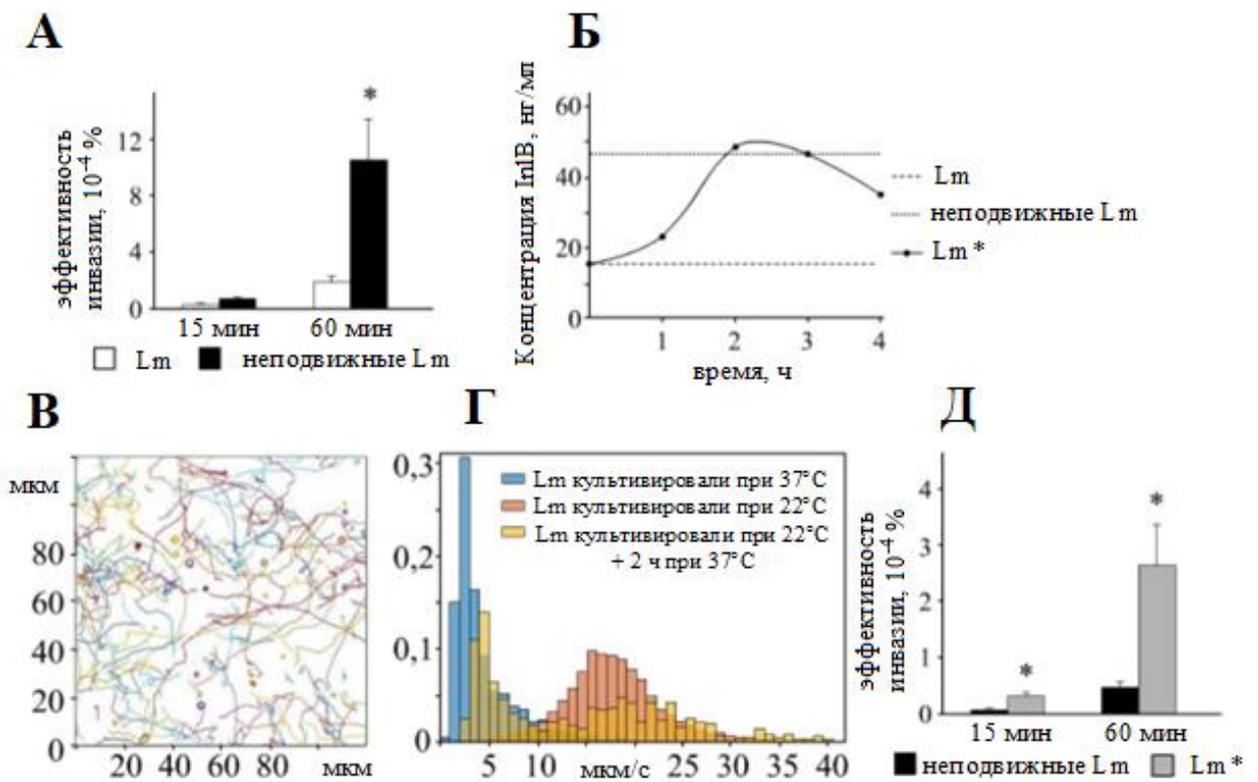


Рисунок 25. Эффективность инвазии *L. monocytogenes* в клетки HEp-2 в зависимости от подвижности и продукции InlB. (А) – эффективность инвазии подвижных и неподвижных *L. monocytogenes*. (Б) – Уровни продукции InlB: (В) – индивидуальные траектории бактерий *L. monocytogenes**, выращенных при 22°C и переведенных на 37°C в течение двух часов; (Г) – распределение индивидуальных скоростей для *L. monocytogenes* (розовый; рост при 22°C), неподвижного *L. monocytogenes* (синий, рост при 37°C) и *L. monocytogenes** (желтый; рост при 22°C с последующим сдвигом на 2 часа). до 37°C) культуры; (Д) - эффективность инвазии *L. monocytogenes** и неподвижных *L. monocytogenes*.

Так же, как описано ранее, бактерии инкубировали совместно с клетками HEp-2 15 или 60 минут, после чего добавляли гентамицин (рис. 25, А). InlB обнаруживали на поверхности бактерий с помощью иммуноферментного анализа, как описано в разделе «Материалы и методы». Подвижность бактерий, перенесенных на 37°C на 2 ч, изучали, как описано

выше (рис. 25, В), и сравнивали с подвижностью культур, выращенных при 22°C и 37°C (рис. 25, Г). Культуру, выращенную в течение ночи при температуре окружающей среды и перенесенную на 2 ч на 37°C, обозначили как *L. monocytogenes**.

Было установлено, что при таком изменении температуры количество неподвижных бактерий увеличилось и достигло 44% по сравнению с 12% неподвижных бактерий в культуре *L. monocytogenes* при 22°C. Тем не менее, более половины бактерий *L. monocytogenes** были подвижными, а распределение индивидуальных скоростей было сходным в культурах *L. monocytogenes* и *L. monocytogenes** (рис. 25, Г).

Мы сравнили эффективность инвазии неподвижных и подвижных *L. monocytogenes* в гентамициновом тесте. После 15-минутной адгезии инвазия подвижных *L. monocytogenes** была, как минимум, в восемь раз более эффективной, чем инвазия неподвижного *L. monocytogenes* ($p < 0,01$; рис. 25, Е). После 60-минутной адгезии эффективность инвазии подвижных *L. monocytogenes** и неподвижных *L. monocytogenes* различалась в 2,5 раза ($p < 0,01$), несмотря на гораздо большее количество неподвижных бактерий, прикрепившихся к поверхности клетки (см. рис. 23, Б).

Таким образом, подвижность заметно улучшала инвазию *in vitro* бактерий, экспрессирующих факторы инвазии.

3.12. Применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности на примере *L. monocytogenes*

Завершающим этапом работы стала оценка возможности использования разработанной системы анализа движения бактерий для экспресс-диагностики чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. В пилотных исследованиях мы использовали модель *L. monocytogenes* и антибиотик гентамицин, являющийся «золотым стандартом» в лечении листериоза. Предварительные данные о чувствительности листерий к гентамицину представлены на рис.26.

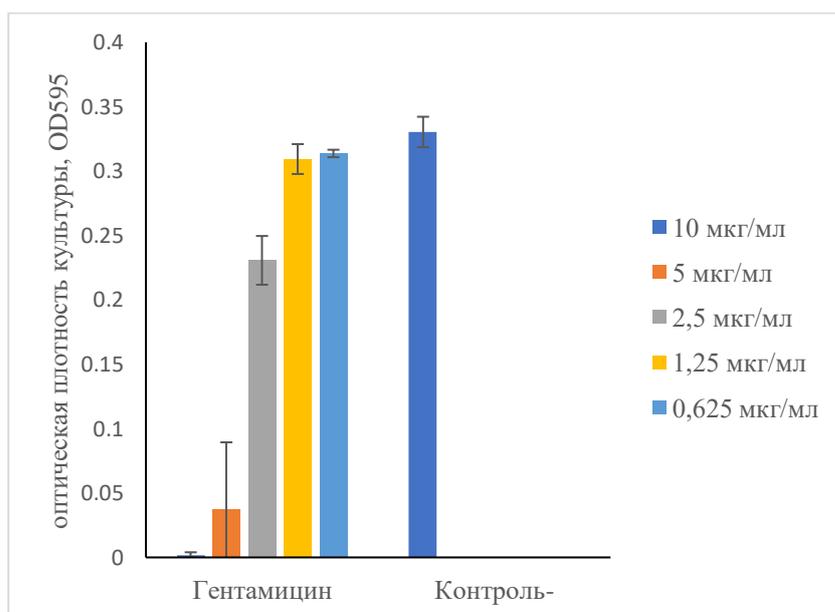


Рисунок 26. Антибиотикограмма *L. monocytogenes* EGDe

Для тестирования разработанной системы анализа паттернов приповерхностного движения мы инкубировали *L. monocytogenes* EGDe в среде, содержащей 100 мкг/мл гентамицина 30,60 и 90 мин (рис. 27-28).

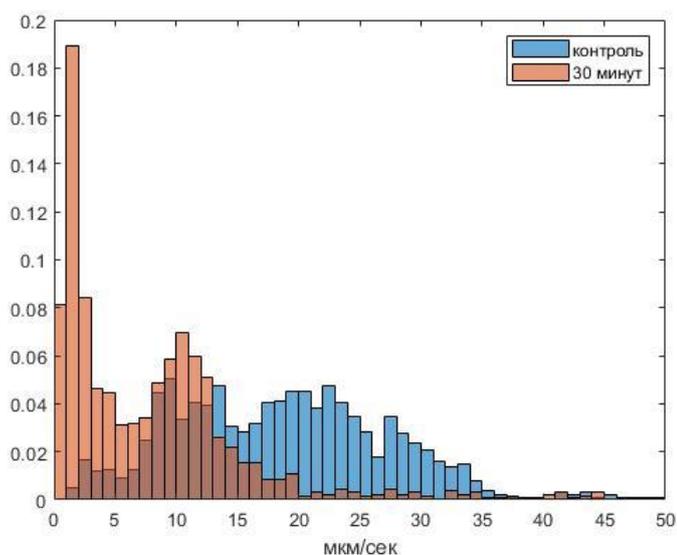


Рисунок 27. Распределение скоростей движения в интактном образце (контроль) и через 30 минут инкубации в растворе гентамицина

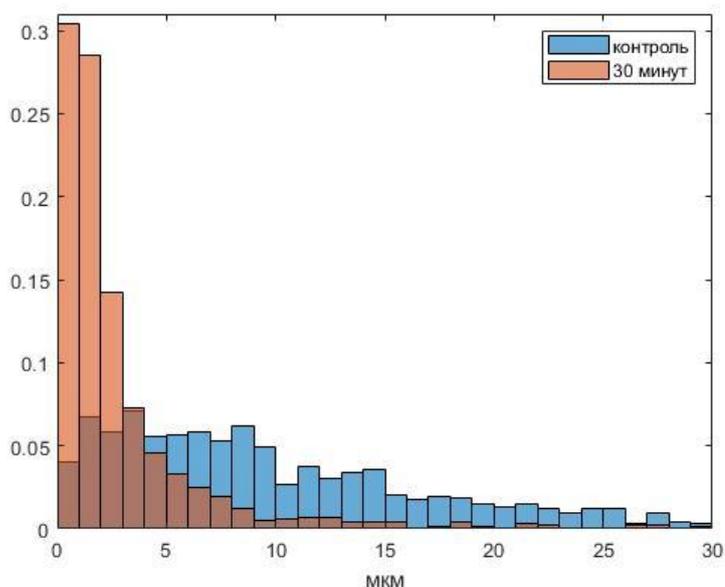


Рисунок 28. Распределение длин траекторий в интактном образце (контроль) и через 30 мин. инкубации в растворе гентамицина

Уже через 30 минут инкубации мы смогли детектировать снижение средней скорости движения микроорганизмов в растворе антибиотика с 20 до 10 мкм/с и смещение средней длины траектории с 12 до 3 мкм.

3.13. Применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности на примере чувствительных и устойчивых к гентамицину штаммов *P. aeruginosa*

В работе использовали два штамма (клинические изоляты) *P. aeruginosa*, штамм 1840 и штамм Pa21. Устойчивость к антибиотику гентамицину была определена методом минимальных ингибирующих концентраций (МИК). В соответствии с полученными данными, минимальная ингибирующая концентрация для штамма *P. aeruginosa* 1840 была 100 мкг/мл (чувствительный штамм), для штамма *P. aeruginosa* Pa21 ингибирования роста не наблюдалось в диапазоне 10 – 1000 мкг/мл (МИК > 1000 мкг/мл - устойчивый штамм) (рис.29).

Ночные культуры штаммов, выращенные в среде ВНИ при 28°C разводили свежей стерильной средой в 100 раз, выращивали культуры с шутелированием 180 об/мин до $OD_{600} \approx 2.0$. Затем культуры делили на 2 одинаковых объема. К одному объему добавляли гентамицин в концентрации 1000 мкг/мл, во второй объем антибиотик не добавляли.

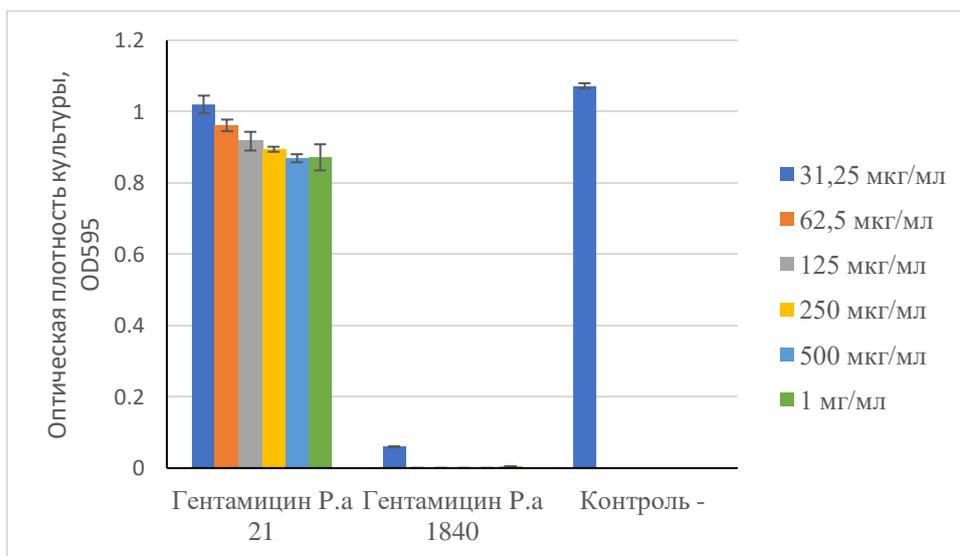


Рисунок 29. Антибиотикограмма *P. aeruginosa* Pa21 и *P. aeruginosa* 1840

Анализ полученных данных показал, что распределение скоростей для чувствительного штамма *P. aeruginosa* 1840, инкубированного в течение 90 минут с гентамицином (1000 мкг/мл), достоверно отличался от распределения скоростей в культуре того же штамма, инкубированного в течение того же времени при тех же условиях без гентамицина (рис. 30). Для оценки достоверности различий использовали тест Колмогорова-Смирнова (рис. 31). Полученная в тесте Колмогорова-Смирнова величина 0,2191 превышает критическую величину из таблицы критических значений Колмогорова-Смирнова для $p=0.05$, которая равна 0,190, что свидетельствует о достоверности различий. Напротив, для штамма Pa21, полученная в тесте Колмогорова-Смирнова величина равна 0,1270 (рис. 30), т.е. меньше критической величины из таблицы критических значений Колмогорова-

Смирнова для $p=0.05$, что говорит об отсутствии достоверных изменений, что совпадает с практически полной идентичностью пиков (Рис. 31).

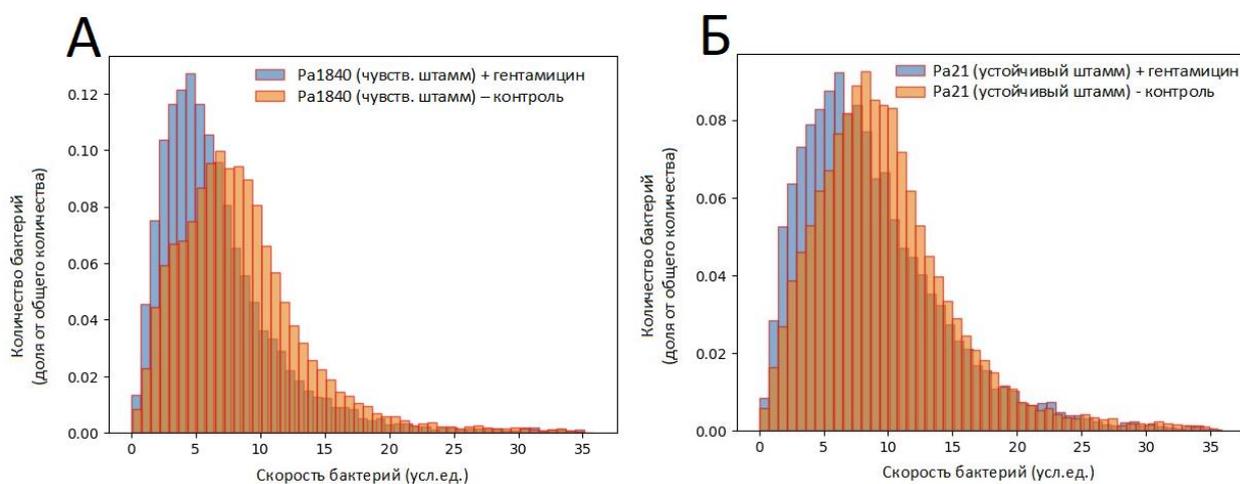


Рисунок 30. Различия в подвижности чувствительного (*P. aeruginosa* 1840) и устойчивого (*P. aeruginosa* Pa21) к гентамицину штаммов.

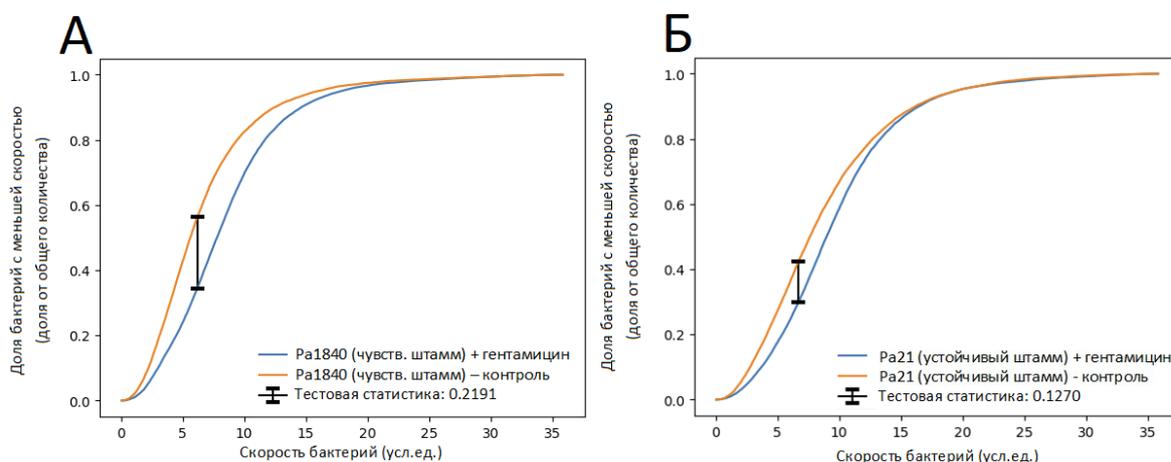


Рисунок 31. Тест Колмогорова-Смирнова для чувствительного (*P. aeruginosa* 1840) и устойчивого (*P. aeruginosa* Pa21) к гентамицину штаммов.

Таким образом, чувствительные к гентамицину бактерии *P. aeruginosa* 1840 достоверно изменили характеристики подвижности (распределение мгновенных скоростей) через 90 минут инкубации с гентамицином. При этом устойчивые к гентамицину бактерии *P. aeruginosa* 21 не изменили характеристики подвижности в аналогичных условиях инкубирования.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что подвижность бактерий является одной из их ключевых характеристик и изучается со времени открытия бактериальных клеток А. Левенгуком, вклад характеристик движения патогенных микроорганизмов в взаимодействие с клетками хозяина установлен далеко не для всех видов. В связи с этим целью данного исследования было охарактеризовать подвижность микроорганизмов в приповерхностном слое и вклад этих характеристик в адгезию и инвазию патогенных и непатогенных видов и штаммов кишечной палочки и листерий. Для этого нами была разработана и валидирована система, состоящая из микрофлюидической камеры, микроскопа и программного обеспечения, позволяющая восстанавливать траектории бактерий на расстоянии 15 мкм от поверхности, рассчитывать среднюю скорость, длину пробега и время нахождения в слое жидкости, а также параметры коллективного движения. Используя эту систему, мы проанализировали характеристики подвижности трех штаммов кишечной палочки, включающих пробиотический и энтеропатогенный, а также непатогенные и патогенные для человека виды листерий.

Анализ движения штаммов кишечной палочки вблизи поверхности впервые выявил значительные отличия в траекториях и характеристиках между энтеропатогенным и пробиотическим штаммами. Начальный этап взаимодействия бактерий с поверхностью, известный как этап лендинга (англ. landing), или выхода из толщи жидкости, важен для дальнейшего развития событий: либо адгезии бактериальной клетки к поверхности, либо продолжения движения [30]. В нашей работе мы сравнивали три штамма: два подвижных, включавших пробиотический штамм M17 и вирулентный штамм O157:H7 ATCC43890, и малоподвижный лабораторный штамм JM109. Модели движения бактерий изучали на расстоянии 10-15 мкм от поверхности, что характерно для стадии лендинга [156].

Параметры среднего и максимального расстояния и времени пребывания в слое, продемонстрированные штаммом JM109, были характерны для броуновского движения, поскольку известно, что JM109 слабо подвижен из-за делеции гена *recA* [75, 155]. Низкая подвижность JM109 была также подтверждена макроскопическим тестом на подвижность. Мы предполагали, что подвижные бактерии будут двигаться параллельно поверхности, демонстрируя большее среднее и максимальное расстояние и меньшее время нахождения в слое, чем JM109. Это предположение было основано на известных моделях лендинга и приповерхностного движения бактерий [29, 59]. Согласно этим моделям, *E. coli*, перемещающиеся на расстоянии 20 мкм или менее от поверхности, переориентируют свои клетки так, чтобы их ось была параллельна поверхности за счет гидродинамических взаимодействий [29, 59]. Действительно, пробиотический штамм M17 продемонстрировал такое поведение: микроорганизмы двигались по длинным, горизонтально ориентированным траекториям.

Однако пробиотический штамм *E. coli* M17 оказался единственным штаммом, который предсказуемо двигался в наших экспериментах. Подвижный вирулентный штамм ATCC43890, обладающий сходной с M17 подвижностью в макроскопическом тесте на полужидком агаре, имел короткие траектории и среднюю длину пробега. При этом данные характеристики были даже меньше, чем у малоподвижного штамма JM109. Эти данные позволяют предположить, что ATCC43890 быстро покидал слой жидкости и двигался преимущественно в вертикальном направлении. Ранее Irina и др. также использовали энтерогеморрагический штамм *E. coli* серотипа O157:H7 для изучения характера его движения вблизи стеклянной поверхности [152]. Они наблюдали плавные круговые траектории, обусловленные прерыванием движения бактерий короткими остановками ('временной адгезией') [152]. Авторами был сделан вывод, что такие траектории обеспечивают бактериям более быстрое распространение и исследование поверхности, что может быть выгодно для всех бактерий, вне зависимости от патогенности. Мы не

наблюдали такого поведения бактериальных клеток, поскольку сосредоточились на этапе лендинга (выхода из толщи жидкости), исключая взаимодействие бактерий с поверхностью. Тем не менее, для подтверждения гипотезы о доминирующем вертикальном направлении движения штамма ATCC43890 необходимы дальнейшие наблюдения за перемещением микроорганизма в трехмерном пространстве.

Следующим параметром, который мы анализировали, были особенности коллективного поведения бактерий. С физической точки зрения, подвижные бактерии – это активные броуновские частицы, способные преобразовывать внешнюю энергию в кинетическую энергию движения [29, 30, 59, 127, 172]. Исходя из этого определения, суспензия подвижных бактерий представляет собой частный случай активной среды, которая может характеризоваться образованием зон с выровненными динамическими кластерами, вихрями и струями, особенно при увеличении концентрации бактерий [177, 178], аналогично [178, 204] тому, что мы наблюдали при выравнивании векторов скорости M17. Однако штамм ATCC43890 продемонстрировал субдиффузионное поведение и, вероятно, коллективное движение в вертикальном направлении. К настоящему времени мы не нашли опубликованных данных о таком поведении подвижных бактерий, которое продемонстрировал в наших условиях штамм ATCC43890, что говорит о необходимости дальнейшего изучения этого явления.

Мы предположили, что наблюдаемая разница в подвижности между пробиотическими и вирулентными штаммами может коррелировать с эффективностью их адгезии к пластику и эукариотическим клеткам. В совокупности данные высевов и микроскопического исследования показали, что малоподвижный штамм JM109 склонен к самоагрегации, формированию бесформенных флокул из нескольких клеток и седиментации флокул под действием силы тяжести. Этот результат кажется тривиальным. Адгезия штамма M17 в виде длинных цепочек из бактерий была более интересным наблюдением. Эти линейные скопления клеток обнаруживались как на

пластиковых поверхностях, так и на поверхности клеточного монослоя. При этом цепочки бактерий штамма M17 были сформированы на границе между клетками. Поэтому первым предположением было то, что бактерии M17 специфически взаимодействовали с рецепторами, расположенными в области межклеточных контактов. Однако это предположение противоречило наблюдению аналогичных структур, образованных на пластиковых поверхностях. Чтобы объяснить линейный характер адгезии M17, мы предположили, что адгезия в виде цепочек клеток (линейных структур) является прямым следствием коллективного горизонтального однонаправленного движения, демонстрируемого этим штаммом. Мы предположили, что это коллективное однонаправленное движение приводит к образованию локальных "зон торможения", когда взаимодействие с препятствием останавливает движение хотя бы одной бактерии. Любое препятствие, замедляющее или останавливающее движение одной бактерии, должно приводить к образованию ряда замедленных или заблокированных бактерий, то есть "зоны адгезии" (рис. 15). Такая коллективная адгезия должна повышать эффективность колонизации поверхности. Аналогичное поведение, например, наблюдалось для *Salmonella Typhimurium* [132] и сапрофитических штаммов *E. coli* [74]. Frommel с соавт. назвали его глобальной стратегией адгезии для комменсальных *E. coli*. Препятствиями, приводящими к формированию линейных структур бактериальных клеток, могут быть совсем незначительные неровности на пластиковой поверхности. При изучении формы поверхности межклеточных контактов в монослое эпителиальных клеток сканирующая электронная микроскопия выявила вертикальные «бортики», образованные межклеточными соединениями [43]. Хотя эти неровности составляли около 200 нм в высоту, этого могло быть достаточно, чтобы замедлить скорость хотя бы одной бактерии. В результате можно предположить лавинообразное увеличение количества бактерий в этой зоне и формирование цепочек по границе клеток. Таким образом, мы выдвинули

предположение, что горизонтально ориентированное коллективное движение может определять особенности рисунка и высокую эффективность адгезии.

Бактерии штамма ATCC43890 демонстрировали иной характер движения и равномерное распределение одиночных или двойных клеток на пластиковой и клеточных поверхностях. Мы предположили, что такой тип адгезии может быть следствием вертикального характера движения. Учитывая, что для вирулентности ATCC43890 необходимо лиганд-рецепторное взаимодействие, такое поведение может быть полезным для поиска рецепторов. Такое "вертикальное" движение может быть перспективным и для внутриклеточных паразитов. Например, было показано, что *S. Typhimurium* выбирает сферические митотические клетки для инвазии [132], и существует корреляция между количеством соседних эукариотических клеток и эффективностью бактериальной инвазии [200]. Еще одним фактором, влияющим на инвазию, является угол взаимодействия бактерий с поверхностью. Для кишечных патогенов критически важным является проникновение в слой слизи, покрывающий поверхность клеток, и подвижность облегчает этот процесс [77]. Очевидно, что кратчайшая траектория в этом случае проходит вниз через защитный слой под углом, близким к 90°. Недавно Otte с соавторами установили, что именно активное движение *S. Typhimurium*, а не хемотаксис, как предполагали ранее, является наиболее важной стратегией для взаимодействия с клетками хозяина, так как адгезия от параметров бактериальной подвижности и была случайным, а не направленным процессом [145].

Таким образом, основываясь на полученных данных, мы предложили два паттерна бактериальной подвижности для повышения эффективности адгезии: горизонтальное и вертикальное движение на стадии лендинга. Горизонтальное движение, характеризующееся коллективным направленным движением микроорганизмов в пределах горизонтального слоя, может обеспечить более эффективную неспецифическую колонизацию поверхности. Движение в вертикальном направлении может способствовать более быстрому переходу от

плавания в толще жидкости к выходу из этого слоя и "протестировать" поверхность, увеличивая тем самым вероятность взаимодействия с рецептором (рис. 32). Таким образом, индивидуальные различия в характере подвижности могут лежать в основе разных стратегий адгезии.

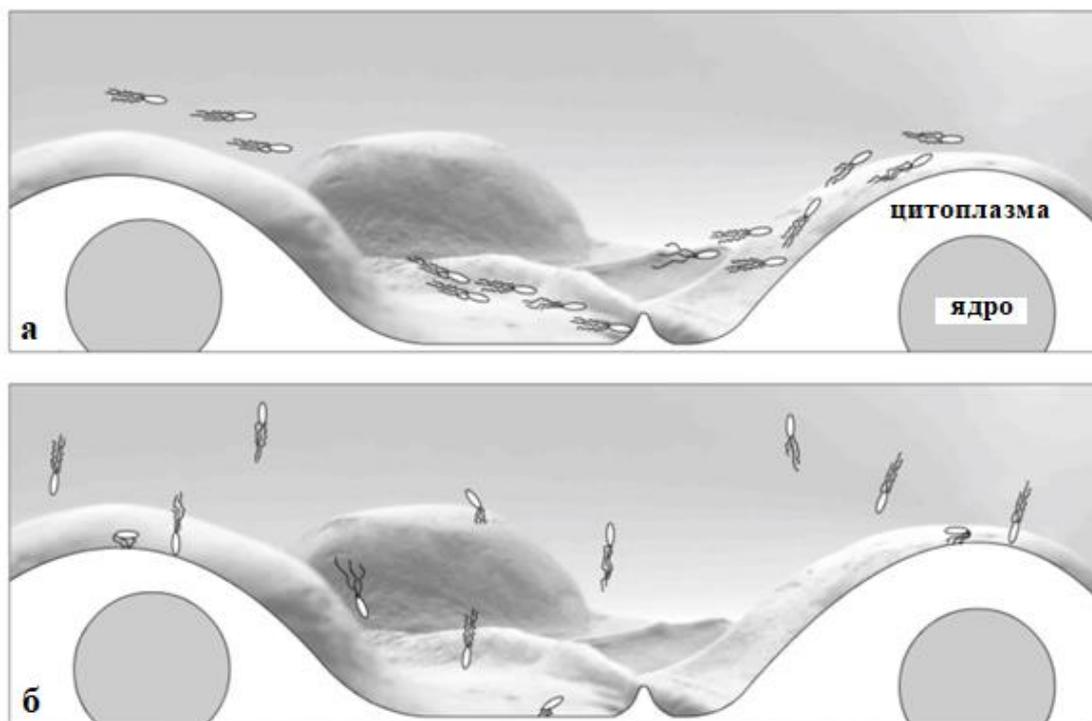


Рисунок 32. Роль горизонтального (а) и вертикального (б) движения в адгезии к поверхности.

Горизонтальная стратегия подразумевает коллективное направленное движение преимущественно в горизонтальном слое с постепенным медленным приближением к поверхности и формирование линейных рисунков адгезии вблизи неровностей поверхности. Вертикальная стратегия подразумевает ненаправленное движение в основном в вертикальном направлении и равномерный рисунок адгезии.

Используя созданный нами подход к анализу данных о траекториях движения и коллективном поведении бактерий, мы оценили вклад паттернов движения патогенных и непатогенных видов листерий в их адгезию и инвазию.

В отличие от *E. coli*, которые имели различия в характеристиках движения на уровне штаммов, патогенный *L. monocytogenes*, его ближайший сапрофитический вид *L. innocua*, а также более далекие сапрофитические виды *L. seelegeri*, *L. ivanovii* демонстрировали сходные характеристики подвижности. Это наблюдение позволяет предположить, что для листерий характер подвижности был связан с вирулентностью.

Воссоздав отдельные траектории движения листерий и проведя их анализ, мы установили анизотропный характер распределения векторов движения (рис. 21), что свидетельствовало об определенной координации движущихся клеток. Такая координация могла возникнуть в результате неупругих столкновений клеток и парных взаимодействий соседних клеток. Такие парные взаимодействия бактериальных клеток невозможны в толще суспензии, где бактерии избегают друг друга, но, по-видимому, возможны на стадии приповерхностного движения [90, 185].

Чтобы выявить роль подвижности на стадии приповерхностного движения для дальнейшего взаимодействия бактерий с поверхностью, мы сравнили паттерны адгезии подвижных и неподвижных *Listeria* spp к пластику или к поверхности эпителиальных клеток HEp-2. Подвижные бактерии продемонстрировали четкие различия в характере адгезии в зависимости от типа поверхности. Как патогенные, так и сапрофитические *Listeria* spp адгезировались на пластике равномерно в виде одиночных или парных клеток, но на поверхности клеток HEp-2 они скапливались преимущественно на периферии, избегая области над клеточным ядром. Последний результат согласуется с результатами, полученными Misselwitz и соавторами, которые продемонстрировали на другом пищевом патогене *Salmonella Typhimurium*, что подвижность на стадии приповерхностного движения приводит к преимущественному прикреплению сальмонелл в зонах с выраженной топологией, т.е. у основания округлых клеток и выростов мембраны [132]. Аналогичную адгезию в топологически выделяющихся местах мы наблюдали у штамма *E. coli* M17 [2]. Однако *E. coli* M17 предпочтительно адгезировались

в тех зонах, где были обнаружены физические препятствия, независимо от того, были это дефекты на пластике или неровности на поверхности клетки. В то же самое время подвижные листерии равномерно распределялись по поверхности пластика. Помимо физических препятствий, неравномерность распределения листерий по поверхности клеток могла быть обусловлена чувствительностью к другим свойствам поверхности, таким как наноразмерные изменения в скольжении по поверхности или взаимодействия с поверхностными рецепторами [87]. Тем не менее, сходство паттернов адгезии, демонстрируемых подвижными патогенными *L. monocytogenes* и сапрофитическими *L. innocua*, свидетельствовало против взаимодействия со специфическими рецепторами на стадии временной остановки. Мы предположили, что причиной наблюдаемой неравномерности распределения листерий по поверхности клеток являлся, скорее всего, именно характер подвижности на стадии приповерхностного движения, но не свойства вирулентности.

Однако, как показали наши дальнейшие исследования, подвижность в совокупности с активацией регулона вирулентности позволяли *L. monocytogenes* более эффективно проникать в клетки-мишени. В частности, температурно-зависимая апрегуляция регулона вирулентности, в том числе фактора инвазии интерналина *InlB* являлась ключевым фактором, обеспечивающим преимущество в инвазии для подвижных *L. monocytogenes* по сравнению с неподвижными бактериями. В условиях, когда подвижные и неподвижные *L. monocytogenes* экспрессировали инвазин *InlB* на одинаковом уровне, подвижные *L. monocytogenes* проникали в клетки хозяина в 8 раз эффективнее по сравнению с неподвижными *L. monocytogenes*. Эти результаты позволили предположить, что расположение бактерий на периферии клетки, обусловленное подвижностью, является важным для дальнейших событий, необходимых для активной инвазии *L. monocytogenes* в эпителиальные клетки. В частности, периферическое расположение листерий может играть роль во взаимодействии с рецепторами клеточной поверхности, важными для инвазии,

которые расположены в областях межклеточных контактов. Так, E-кадгерин, который является рецептором для фактора инвазии листерий InlA, является важным белком межклеточной адгезии [52]. Рецептор InlB с-Met в значительной степени распределен в динамических нерастворимых фракциях плазматической мембраны, известных как липидные рафты, которые имеют тенденцию перемещаться к клеточной периферии и плотным контактам [63, 118]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что скопление бактерий на периферии клетки, обусловленное подвижностью, выгодно для патогенных *L. monocytogenes*, так как может улучшить рецептор-зависимую инвазию в клетку.

Перевод культуры *L. monocytogenes*, выращенной при температуре окружающей среды, на 2 часа к температуре тела человека был достаточен для повышения экспрессии фактора инвазии при сохранении подвижности бактерий. Этот период сопоставим с временем, необходимым для попадания зараженной пищи в кишечник, что позволяет предположить, что механизмы, включающие повышение экспрессии факторов инвазии и поддержания подвижности, могут иметь значение при инфицировании человека.

В совокупности полученные результаты показали, что подвижность на стадии приповерхностного движения *Listeria* spp не зависела от вирулентности. Схожие паттерны подвижности и адгезии патогенного вида *L. monocytogenes* и его сапрофитического аналога-«близнеца» *L. innocua* исключали роль факторов вирулентности в неравномерном распределении бактерий по поверхности клеток. Однако именно специфическая подвижность на стадии приповерхностного движения определяла преимущественное распределение *Listeria* spp на периферии клетки. Такое периферическое расположение улучшало инвазию *L. monocytogenes* в клетки человека в условиях температурно-зависимой арегуляции факторов вирулентности. Полученные результаты позволили предположить, что обусловленное подвижностью накопление бактерий на периферии клетки может быть

преимуществом для патогенов, взаимодействующих с рецепторами, расположенными на апикальных стыках.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что характеристики подвижности могут быть не только видо-, но и штаммоспецифичными, как это было установлено для кишечной палочки. Паттерны подвижности бактерий на стадии лендинга позволяют формировать разные рисунки адгезии в виде равномерно и неравномерно распределенных клеток и их скоплений. Как в случае с энтеропатогенным штаммом кишечной палочки ATCC43890, так и вирулентным видом *L. monocytogenes* подвижность, по-видимому, обеспечивает преимущества в поиске специфических рецепторов на поверхности эукариотической клетки. Это предположение, а также предложенная нами модель «горизонтального» и «вертикального» перемещения бактерий на этапе выхода из толщи к поверхности требуют дальнейших исследований с более широким набором тестируемых видов и штаммов. В будущем мы планируем выполнить эту работу с использованием системы анализа паттернов приповерхностного движения, разработанной нами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы была разработана конфигурация микрофлюидической камеры, отвечающая параметрам простоты изготовления, возможности наблюдения за подвижностью бактерий в приповерхностном слое и получения видеоизображений приемлемого качества для дальнейшей их обработки и анализа. Было установлено, что первичный анализ видеоизображений с определением средней скорости, среднего времени нахождения в слое, вычленения отдельных траекторий, распределения популяции бактерий по этим характеристикам может быть осуществлен с использованием программного обеспечения Matlab и Plasma4.0. Разработанная система имеет высокую чувствительность (может детектировать различия в скорости в диапазоне 0,3-0,5 мкм/с). Она была валидирована на подвижных *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes* в условиях разной вязкости раствора и концентрации микроорганизмов. Бактериальные суспензии, охарактеризованные с помощью разработанной системы анализа паттернов (ключевых параметров) приповерхностного движения, имели штаммовые и видовые различия. Так, было установлено, что сапрофитический штамм *E. coli* M17 имел направленное коллективное движение в приповерхностном слое, что коррелировало с более высоким уровнем адгезии. При этом наблюдались скопления бактерий в межклеточном пространстве, что, по-видимому, повышало эффективность колонизации биотической поверхности. Для энтерогеморрагического штамма ATCC43890 было характерно перемещение преимущественно в вертикальной плоскости и короткое время нахождения в слое. Это может облегчать поиск рецепторов для взаимодействия с эукариотической клеткой и, тем самым, реализацию патогенных свойств. На примере 4 видов используемых в работе листерий (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) было установлено, что, несмотря на то, что все они имели сходные паттерны приповерхностного движения, высокие средние скорости (17-27 мкм/с), формировали скопления в области межклеточных контактов, для патогенного для человека и животных

вида *L. monocytogenes* это позволяло сконцентрироваться в зоне локализации необходимых для инвазии рецепторов E-кадгерин и C-Met, что приводило к повышению эффективности инвазии в 8 раз.

С целью практического использования разработанной системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий нами были подобраны условия, при которых можно было оценить изменения в подвижности бактерий для прогнозирования уровня антибиотикоустойчивости на примере *L. monocytogenes* и *P. aeruginosa*. Система позволяла детектировать изменения в жизнеспособности *L. monocytogenes* через 30 минут инкубации в среде с гентамицином: уменьшение средней скорости движения с 20 до 10 мкм/с и средней длины траекторий с 12 до 3 мкм. В случае с *P. aeruginosa* чувствительные к гентамицину бактерии достоверно изменили характеристики подвижности (распределение мгновенных скоростей) через 90 минут инкубации с гентамицином. При этом устойчивые к гентамицину бактерии *P. aeruginosa* не изменили характеристики подвижности в аналогичных условиях инкубирования.

Таким образом, в ходе выполнения работы была разработана система анализа подвижности микроорганизмов, проведена ее валидация, получены новые фундаментальные данные об особенностях приповерхностного движения патогенных и сапрофитических микроорганизмов и вкладе этой подвижности в их адгезию и инвазию. Подтверждена возможность использования данной системы для прогнозирования уровня антибиотикоустойчивости подвижных бактерий.

ВЫВОДЫ

1. Создана система анализа паттернов приповерхностного движения микроорганизмов с использованием 3D печати микрофлюидических камер и программной обработки микровидеосъемки помещенных в камеры бактерий.

2. Проведена валидация разработанной системы на подвижных патогенных бактериях *E. coli* и *L. monocytogenes*. Показано, что разработанная система обладает чувствительностью к изменению средних скоростей бактерий в диапазоне 0,3-0,5 мкм/с и детектирует изменения траекторий микроорганизмов при изменении параметров вязкости и концентрации подвижных частиц.

3. Впервые выявлены различия в паттернах подвижности штаммов *E. coli*: энтерогеморрагического штамма O157:H7 и пробиотического штамма M17. Показано, что коллективное движение сапрофитического штамма M17 параллельно поверхности коррелировало с формированием скоплений бактерий в местах межклеточных контактов. Движение энтеропатогенного штамма ATCC43890 преимущественно в вертикальной плоскости приводило к равномерному распределению возбудителя на поверхности клеток, что может быть связано с более успешным поиском рецепторов для взаимодействия с эукариотической клеткой и реализации патогенных свойств

4. Впервые установлено, что все виды используемых в работе листерий (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) имели сходные паттерны приповерхностного движения, аналогичные паттернам штамма *E. coli* M17, что приводило к образованию скоплений бактерий в местах межклеточных контактов и увеличивало эффективность инвазии штамма EGDe патогенного вида *L. monocytogenes* в клетки человека Hep-2 в 8 раз по сравнению с неподвижной культурой того же штамма.

5. Установлено, что система анализа паттернов приповерхностного движения бактерий может быть использована для прогнозирования уровня антибиотикочувствительности: она позволяла детектировать изменения в

жизнеспособности чувствительных и устойчивых к гентамицину *L.monocytogenes* и *P.aeruginosa* через 30 и 90 минут инкубации, соответственно, что выражалось в уменьшении средней скорости движения, средней длины траекторий и в изменении распределения мгновенных скоростей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИФА – иммуноферментный анализ

BHI – Brain Heart Infusion (сердечно-мозговой экстракт)

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

BSA – бычий сывороточный альбумин

InlA – интерналин А

InlB – интерналин В

Linn – *L. innocua*

Lm – *L. monocytogenes*

MSD – среднее квадратичное отклонение

NSS – приповерхностное плавание

PBS – фосфатно-солевой буфер

PC-PLC – фосфатидилхолин-специфическая фосфолипаза

PI-PLC – фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза С

SD – стандартное отклонение

TBST – трис-буферный физиологический раствор

Анти-InlB-HRP – конъюгат кроличьих поликлональных InlB-специфичных антител с пероксидазой хрена

КОЕ – колониеобразующие единицы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abby S. S., Rocha E. P. C. The Non-Flagellar Type III Secretion System Evolved from the Bacterial Flagellum and Diversified into Host-Cell Adapted Systems // *PLoS Genetics*. 2012. № 9 (8).
2. Abdulkadieva M. M. et al. Strain specific motility patterns and surface adhesion of virulent and probiotic *Escherichia coli* // *Scientific Reports*. 2022. № 1 (12).
3. Abrusci P. et al. Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus // *Nature Structural and Molecular Biology*. 2013. № 1 (20). P. 99–104.
4. Adler J. Chemotaxis in Bacteria // *Science*. 1966. № 3737 (153). P. 708–716.
5. Agbor T. A., McCormick B. A. Salmonella effectors: Important players modulating host cell function during infection // *Cellular Microbiology*. 2011. V. 13. № 12. P. 1858–1869.
6. Aihara E. et al. Motility and Chemotaxis Mediate the Preferential Colonization of Gastric Injury Sites by *Helicobacter pylori* // *PLoS Pathogens*. 2014. № 7 (10).
7. Alirezaeizanjani Z. Movement strategies of a multi-mode bacterial swimmer 2020.
8. Allen-Vercoe E., Woodward M. J. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. 1999.
9. Altindal T., Xie L., Wu X. L. Implications of three-step swimming patterns in bacterial chemotaxis // *Biophysical Journal*. 2011. № 1 (100). P. 32–41.
10. Amores G. R. et al. Systematic identification of novel regulatory interactions controlling biofilm formation in the bacterium *Escherichia coli* // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7).
11. Antani J. D. et al. Mechanosensitive recruitment of stator units promotes binding of the response regulator CheY-P to the flagellar motor // *Nature Communications*. 2021. № 1 (12).

12. Armitage J. P., Macnab R. M. Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides* // *Journal of Bacteriology*. 1987. № 2 (169). P. 514–518.
13. Armon L., Eisenbach M. Behavioral Mechanism during Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation // *PLoS ONE*. 2011. № 12 (6). P. e28359.
14. Arora S. K. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Flagellar Cap Protein, FliD, Is Responsible for Mucin Adhesion. 1998.
15. Asai Y. et al. Putative Channel Components for the Fast-Rotating Sodium-Driven Flagellar Motor of a Marine Bacterium. 1997.
16. Baban S. T. et al. The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain // *PLoS ONE*. 2013. № 9 (8).
17. Baqar S. et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Campylobacter jejuni* flagellum-secreted proteins in mice // *Infection and Immunity*. 2008. № 7 (76). P. 3170–3175.
18. Barilleau E. et al. Investigation of the invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PagN of *Salmonella Typhimurium* // *BMC Microbiology*. 2021. № 1 (21).
19. Bechinger C. et al. Active particles in complex and crowded environments // *Reviews of Modern Physics*. 2016. № 4 (88).
20. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria // *Trends in Microbiology*. 2014. V. 22. № 9. P. 517–527.
21. Berg H. C. *Random walks in biology* / H. C. Berg, 1993.
22. Berg H. C. Motile behavior of bacteria // *Physics Today*. 2000. № 1 (53). P. 24–29.
23. Berg H. C. The rotary motor of bacterial flagella // *Annual Review of Biochemistry*. 2003. V. 72. P. 19–54.
24. Berg H. C., Anderson R. A. Bacteria Swim by Rotating their Flagellar Filaments // *Nature* 1973 245:5425. 1973. № 5425 (245). P. 380–382.

25. Berg H. C., Berry R. M. E. Coli in motion // *Physics Today*. 2005. № 2 (58). P. 64–65.
26. Berg H. C., Brown D. A. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by Three-dimensional Tracking // *Nature*. 1972. № 5374 (239). P. 500–504.
27. Berg H. C., Turner L. Movement of microorganisms in viscous environments // *Nature*. 1979. № 5702 (278). P. 349–351.
28. Berg H. C., Turner L. Chemotaxis of bacteria in glass capillary arrays. *Escherichia coli*, motility, microchannel plate, and light scattering // *Biophysical Journal*. 1990. № 4 (58). P. 919–930.
29. Berke A. P. et al. Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces // *Physical Review Letters*. 2008. № 3 (101).
30. Berne C. et al. Bacterial adhesion at the single-cell level // *Nature Reviews Microbiology*. 2018. V. 16. № 10. P. 616–627.
31. Bhavsar A. P., Guttman J. A., Finlay B. B. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens // *Nature*. 2007. V. 449. № 7164. P. 827–834.
32. Bianchi S., Saglimbeni F., Leonardo R. Di Holographic imaging reveals the mechanism of wall entrapment in swimming bacteria // *Physical Review X*. 2017. № 1 (7).
33. Bigot A. et al. Role of FliF and FliI of *Listeria monocytogenes* in flagellar assembly and pathogenicity // *Infection and Immunity*. 2005. № 9 (73). P. 5530–5539.
34. Blair D. F. How Bacteria sense and swim // *Annual Review of Microbiology*. 1995. № 1 (49). P. 489–520.
35. Blount Z. D. The natural history of model organisms.
36. Boelaert F. et al. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017 // *EFSA Journal*. 2018. № 12 (16).
37. Boin M. A., Austin M. J., Häse C. C. Chemotaxis in *Vibrio cholerae* // *FEMS Microbiology Letters*. 2004. V. 239. № 1. P. 1–8.

38. Bolton D. J. Campylobacter virulence and survival factors // *Food Microbiology*. 2015. V. 48. P. 99–108.
39. Bonifield H. R., Hughes K. T. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism // *Journal of Bacteriology*. 2003. № 12 (185). P. 3567–3574.
40. Braun T. F. et al. Arrangement of Core Membrane Segments in the MotA/MotB Proton-Channel Complex of *Escherichia coli* // *Biochemistry*. 2004. № 1 (43). P. 35–45.
41. Bren A., Eisenbach M. How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation // *Journal of Bacteriology*. 2000. № 24 (182). P. 6865–6873.
42. Briegel A. et al. Bacterial chemoreceptor arrays are hexagonally packed trimers of receptor dimers networked by rings of kinase and coupling proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. № 10 (109). P. 3766–3771.
43. Brückner B. R., Janshoff A. Importance of integrity of cell-cell junctions for the mechanics of confluent MDCK II cells // *Scientific Reports*. 2018. № 1 (8).
44. Butler S. M., Camilli A. Both chemotaxis and net motility greatly influence the infectivity of *Vibrio cholerae*. 2004.
45. Butler S. M., Camilli A. Going against the grain: Chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae* // *Nature Reviews Microbiology*. 2005. V. 3. № 8. P. 611–620.
46. Carter M. Q., Feng D., Li H. H. Curli fimbriae confer shiga toxin-producing *Escherichia coli* a competitive trait in mixed biofilms // *Food Microbiology*. 2019. (82). P. 482–488.
47. Chaban B., Hughes H. V., Beeby M. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015. V. 46. P. 91–103.
48. Charlier C., Disson O., Lecuit M. Maternal-neonatal listeriosis // *Virulence*. 2020. V. 11. № 1. P. 391–397.
49. Chawla R. et al. A Skeptic’s Guide to Bacterial Mechanosensing // *Journal of Molecular Biology*. 2020. V. 432. № 2. P. 523–533.

50. Chevance F. F. V., Hughes K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine // *Nature Reviews Microbiology*. 2008. V. 6. № 6. P. 455–465.
51. Coburn B., Grassl G. A., Finlay B. B. Salmonella, the host and disease: A brief review // *Immunology and Cell Biology*. 2007. V. 85. № 2. P. 112–118.
52. Coopman P., Djiane A. Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016. V. 73. № 18. P. 3535–3553.
53. Cossart P. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions // *Trends in Cell Biology*. 2003. № 1 (13). P. 23–31.
54. Croxen M. A., Finlay B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // *Nature Reviews Microbiology*. 2010. V. 8. № 1. P. 26–38.
55. Damton N. C. et al. Dynamics of bacterial swarming // *Biophysical Journal*. 2010. № 10 (98). P. 2082–2090.
56. Darnton N. C. et al. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 2007. № 5 (189). P. 1756–1764.
57. Davey M. E., O’toole G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. № 4 (64). P. 847–867.
58. Denissenko P. et al. Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. № 21 (109). P. 8007–8010.
59. Desai N., Ardekani A. M. Biofilms at interfaces: Microbial distribution in floating films // *Soft Matter*. 2020. № 7 (16). P. 1731–1750.
60. Diepold A., Armitage J. P. Type III secretion systems: The bacterial flagellum and the injectisome // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015. V. 370. № 1679.
61. Dons L. et al. Role of Flagellin and the Two-Component CheA/CheY System of *Listeria monocytogenes* in Host Cell Invasion and Virulence. 2004.

62. Duan Q. et al. Flagella and bacterial pathogenicity // *Journal of Basic Microbiology*. 2013. № 1 (53). P. 1–8.

63. Duhon D. et al. The polyphenol epigallocatechin-3-gallate affects lipid rafts to block activation of the c-Met receptor in prostate cancer cells // *Molecular Carcinogenesis*. 2010. № 8 (49). P. 739–749.

64. Dusenbery D. B. Minimum size limit for useful locomotion by free-swimming microbes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. № 20 (94). P. 10949–10954.

65. Egan F., Barret M., O’Gara F. The SPI-1-like Type III secretion system: More roles than you think // *Frontiers in Plant Science*. 2014. T. 5. № FEB.

66. Einstein A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen // *Annalen der Physik*. 1905. № 8 (322). P. 549–560.

67. Eisenstecken T., Hu J., Winkler R. G. Bacterial swarmer cells in confinement: A mesoscale hydrodynamic simulation study // *Soft Matter*. 2016. № 40 (12). P. 8316–8326.

68. Erdem A. L. et al. Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 2007. № 20 (189). P. 7426–7435.

69. Erickson D., Li D. Integrated microfluidic devices // *Analytica Chimica Acta*. 2004. V. 507. № 1. P. 11–26.

70. Farfan M. J., Torres A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains // *Infection and Immunity*. 2012. V. 80. № 3. P. 903–913.

71. Faulds-Pain A. et al. Flagellin redundancy in *Caulobacter crescentus* and its implications for flagellar filament assembly // *Journal of Bacteriology*. 2011. № 11 (193). P. 2695–2707.

72. Finlay B. B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity // *Microbiological Reviews*. 1989. № 2 (53). P. 210–230.

73. Freter R., O'Brien P. C. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: chemotactic responses of *Vibrio cholerae* and description of motile nonchemotactic mutants // *Infection and Immunity*. 1981. № 1 (34). P. 215–221.

74. Frömmel U. et al. Adhesion patterns of commensal and pathogenic *Escherichia coli* from humans and wild animals on human and porcine epithelial cell lines. 2013.

75. Frutos-Grilo E. et al. The Interaction of RecA With Both CheA and CheW Is Required for Chemotaxis // *Frontiers in Microbiology*. 2020. (11).

76. Frymier P. D. et al. Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995. № 13 (92). P. 6195–6199.

77. Furter M. et al. Mucus Architecture and Near-Surface Swimming Affect Distinct *Salmonella Typhimurium* Infection Patterns along the Murine Intestinal Tract // *Cell Reports*. 2019. № 9 (27). P. 2665-2678.e3.

78. Galié S. et al. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods // *Frontiers in Microbiology*. 2018. V. 9. № MAY.

79. Ghelardi E. et al. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis* // *Journal of Bacteriology*. 2002. № 23 (184). P. 6424–6433.

80. Gómez-Laguna J. et al. Virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains recovered from pigs in Spain // *Veterinary Record*. 2020. № 11 (187). P. 101.

81. Goto T. et al. A fluid-dynamic interpretation of the asymmetric motion of singly flagellated bacteria swimming close to a boundary // *Biophysical Journal*. 2005. № 6 (89). P. 3771–3779.

82. Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori* // *Current Microbiology*. 2017. V. 74. № 7. P. 863–869.

83. Harshey R. M. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal // *Annual Review of Microbiology*. 2003. V. 57. P. 249–273.

84. Hayashi F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 // *Nature*. 2001. № 6832 (410). P. 1099–1103.
85. Hill J. et al. Hydrodynamic surface interactions enable escherichia coli to seek efficient routes to swim upstream // *Physical Review Letters*. 2007. № 6 (98).
86. Hsu R., Ganatos P. The motion of a rigid body in viscous fluid bounded by a plane wall // *Journal of Fluid Mechanics*. 1989. (207). P. 29–72.
87. Hu J. et al. Physical sensing of surface properties by microswimmers-directing bacterial motion via wall slip // *Scientific Reports*. 2015. (5).
88. Hughes K. et al. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator // *Science*. 1993. № 5137 (262). P. 1277–1280.
89. Hume P. J. et al. Swiss army pathogen: The Salmonella entry toolkit // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017. V. 7. № AUG.
90. Ishikawa T. et al. Hydrodynamic interactions between two swimming bacteria // *Biophysical Journal*. 2007. № 6 (93). P. 2217–2225.
91. Ito M. et al. MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus*, and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis* // *Molecular Microbiology*. 2004. № 4 (53). P. 1035–1049.
92. Iwu C. D., Okoh A. I. Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: A review // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. V. 16. № 22.
93. Jafari A, Mm A., Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. 2012.
94. Jarrell K. F., McBride M. J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move // *Nature Reviews Microbiology*. 2008. V. 6. № 6. P. 466–476.
95. Jia T. et al. A novel small rna promotes motility and virulence of enterohemorrhagic *escherichia coli* o157:H7 in response to ammonium // *mBio*. 2021. № 2 (12). P. 1–19.

96. Johnson J. et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes // *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. № 7 (70). P. 4256–4266.
97. Josenhans C., Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria // *International Journal of Medical Microbiology*. 2002. № 8 (291). P. 605–614.
98. Kaiser D. Bacterial Swarming: A Re-examination of Cell-Movement Patterns // *Current Biology*. 2007. T. 17. № 14.
99. Kalisky T., Quake S. R. Single-cell genomics // *Nature Methods*. 2011. T. 8. № 4. P. 311–314.
100. Kamiya R. et al. Transition of Bacterial Flagella from Helical to Straight Forms with Different Subunit Arrangements. 1979.
101. Kamp H. D., Higgins D. E. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes* // *PLoS Pathogens*. 2011. № 8 (7).
102. Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli* // *Nature Reviews Microbiology*. 2004. V. 2. № 2. P. 123–140.
103. Kearns D. B. A field guide to bacterial swarming motility // *Nature Reviews Microbiology*. 2010. V. 8. № 9. P. 634–644.
104. Kern W. V., Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens // *Clinical Microbiology and Infection*. 2020. V. 26. № 2. P. 151–157.
105. Khan F. et al. Molecules involved in motility regulation in *Escherichia coli* cells: a review // *Biofouling*. 2020. № 8 (36). P. 889–908.
106. Kim S. Y. et al. Contribution of six flagellin genes to the flagellum biogenesis of *Vibrio vulnificus* and in vivo invasion // *Infection and Immunity*. 2014. № 1 (82). P. 29–42.
107. Kinoshita M., Namba K., Minamino T. Effect of a clockwise-locked deletion in FliG on the FliG ring structure of the bacterial flagellar motor // *Genes to Cells*. 2018. № 3 (23). P. 241–247.

108. Kojima S., Blair D. F. Solubilization and Purification of the MotA/MotB Complex of *Escherichia coli* // *Biochemistry*. 2004. № 1 (43). P. 26–34.
109. Konkel M. E. et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus // *Journal of Bacteriology*. 2004. № 11 (186). P. 3296–3303.
110. Lambert C. et al. Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus* // *Molecular Microbiology*. 2006. № 2 (60). P. 274–286.
111. Lauga E. et al. Swimming in circles: Motion of bacteria near solid boundaries // *Biophysical Journal*. 2006. № 2 (90). P. 400–412.
112. Leclercq A. et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010. № 9 (60). P. 2210–2214.
113. Li G., Tang J. X. Accumulation of microswimmers near a surface mediated by collision and rotational Brownian motion // *Physical Review Letters*. 2009. № 7 (103).
114. Li H., Sourjik V. Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology*. 2011. № 4 (80). P. 886–899.
115. Lingnau A. et al. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms // *Infection and Immunity*. 1995. № 10 (63). P. 3896–3903.
116. Loh E. et al. A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes* // *Cell*. 2009. № 4 (139). P. 770–779.
117. Lowe G., Meister M., Berg H. C. Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria // *Nature* 1987 325:6105. 1987. № 6105 (325). P. 637–640.
118. Lu Y.-C., Chen H.-C. Involvement of lipid rafts in adhesion-induced activation of Met and EGFR. 2011.

119. Luck S. N. et al. Contribution of FliC to epithelial cell invasion by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O113:H21 // *Infection and Immunity*. 2006. № 12 (74). P. 6999–7004.
120. Lymberopoulos M. H. et al. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 Strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract // *Journal of Bacteriology*. 2006. № 18 (188). P. 6449–6459.
121. Macnab R. M. How Bacteria Assemble Flagella // *Annual Review of Microbiology*. 2003. V. 57. P. 77–100.
122. Macnab R. M. Type III flagellar protein export and flagellar assembly // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2004. V. 1694. № 1- 3 SPEC.ISS. P. 207–217.
123. Makarchuk S. et al. Enhanced propagation of motile bacteria on surfaces due to forward scattering // *Nature Communications*. 2019. № 1 (10).
124. Maki N. et al. Motility and Chemotaxis of Filamentous Cells of *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 2000. № 15 (182). P. 4337–4342.
125. Marchetti M. et al. Interaction of pathogenic bacteria with rabbit appendix M cells: Bacterial motility is a key feature in vivo // *Microbes and Infection*. 2004. № 6 (6). P. 521–528.
126. Martins M. et al. Evidence of metabolic switching and implications for food safety from the phenome(s) of salmonella enterica serovar typhimurium dt104 cultured at selected points across the pork production food chain // *Applied and Environmental Microbiology*. 2013. № 18 (79). P. 5437–5449.
127. Mathewson J. J., Cravioto A. PERSPECTIVE HEp-2 Cell Adherence as an Assay for Virulence Among Diarrheagenic *Escherichia coli*. 1989.
128. Mayola A. et al. RecA protein plays a role in the chemotactic response and chemoreceptor clustering of *Salmonella enterica* // *PLoS ONE*. 2014. № 8 (9).
129. McWilliams B. D., Torres A. G. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins // *Microbiology Spectrum*. 2014. № 3 (2).

130. Minamino T. Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2014. V. 1843. № 8. P. 1642–1648.
131. Minnich S. A., Rohde H. N. A rationale for repression and/or loss of motility by pathogenic *Yersinia* in the mammalian host Springer New York, 2007. P. 298–311.
132. Misselwitz B. et al. Near surface swimming of salmonella *Typhimurium* explains target-site selection and cooperative invasion // *PLoS Pathogens*. 2012. № 7 (8). P. 9.
133. Mitchell J. G., Kogure K. Bacterial motility: Links to the environment and a driving force for microbial physics // *FEMS Microbiology Ecology*. 2006. T. 55. № 1. P. 3–16.
134. Mohari B. et al. Multiple Flagellin Proteins Have Distinct and Synergistic Roles in *Agrobacterium tumefaciens* Motility // *Journal of Bacteriology*. 2018. № 23 (200).
135. Molaei M. et al. Failed escape: Solid surfaces prevent tumbling of *Escherichia coli* // *Physical Review Letters*. 2014. № 6 (113).
136. Montesinos E. Change in Size of *Chromatium minus* Cells in Relation to Growth Rate, Sulfur Content, and Photosynthetic Activity: A Comparison of Pure Cultures and Field Populations // *Applied and Environmental Microbiology*. 1987. № 4 (53). P. 864–871.
137. Morimoto Y., Minamino T. Structure and Function of the Bi-Directional Bacterial Flagellar Motor // *Biomolecules*. 2014. № 1 (4). P. 217–234.
138. Morimoto Y. V. et al. Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation // *Journal of Bacteriology*. 2013. № 3 (195). P. 474–481.
139. Nachamkin I. et al. Role of *Campylobacter jejuni* Flagella as Colonization Factors for Three-Day-Old Chicks: Analysis with Flagellar Mutants. 1993.

140. Olivier Dussurget et al. *Listeria monocytogenes* salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis // *Molecular Microbiology*. 2002. № 4 (45). P. 1095–1106.
141. Olsen J. E. et al. The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S. Typhimurium* // *BMC Microbiology*. 2013. № 1 (13). P. 67.
142. O’Neil H. S., Marquis H. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion // *Infection and Immunity*. 2006. № 12 (74). P. 6675–6681.
143. Orsi R. H. et al. Taxonomy, ecology, and relevance to food safety of the genus *Listeria* with a particular consideration of new *Listeria* species described between 2010 and 2022 // *mBio*. 2024. V. 15. № 2. P. 13.
144. O’toole G. A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.
145. Otte S. et al. Statistics of pathogenic bacteria in the search of host cells // *Nature Communications*. 2021. № 1 (12).
146. Ottemann K. M., Miller J. F. MicroReview Roles for motility in bacterial-host interactions.
147. Palma V. et al. Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions // *Microorganisms*. 2022. T. 10. № 3.
148. Parthasarathy G., Yao Y., Kim K. S. Flagella promote *Escherichia coli* K1 association with and invasion of human brain microvascular endothelial cells // *Infection and Immunity*. 2007. № 6 (75). P. 2937–2945.
149. Partridge J. D. et al. *Escherichia coli* Remodels the Chemotaxis Pathway for Swarming // *mBio*. 2019. № 2 (10).
150. Patteson A. E. et al. Running and tumbling with *E. coli* in polymeric solutions // *Scientific Reports*. 2015. (5).

151. Peel M., Donachie W., Shaw A. Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting // *Microbiology*. 1988. № 8 (134). P. 2171–2178.
152. Perez Ipiña E. et al. Bacteria display optimal transport near surfaces // *Nature Physics*. 2019. № 6 (15). P. 610–615.
153. Peters B. et al. Structural and functional dissection reveals distinct roles of Ca²⁺-binding sites in the giant adhesin SiiE of *Salmonella enterica* // *PLOS Pathogens*. 2017. № 5 (13). P. e1006418.
154. Ping L. Y. Cell orientation of swimming bacteria: From theoretical simulation to experimental evaluation // *Science China Life Sciences*. 2012. T. 55. № 3. P. 202–209.
155. Pratt L. A., Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili // *Molecular Microbiology*. 1998. № 2 (30). P. 285–293.
156. Qi M. et al. Landing Dynamics of Swimming Bacteria on a Polymeric Surface: Effect of Surface Properties // *Langmuir*. 2017. № 14 (33). P. 3525–3533.
157. Radoshevich L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis // *Nature Reviews Microbiology*. 2018. V. 16. № 1. P. 32–46.
158. Ramia M., Tullock D. L., Phan-Thien N. The role of hydrodynamic interaction in the locomotion of microorganisms // *Biophysical Journal*. 1993. № 2 (65). P. 755–778.
159. Ramos H. C., Rumbo M., Sirard J. C. Bacterial flagellins: Mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa // *Trends in Microbiology*. 2004. V. 12. № 11. P. 509–517.
160. Rezende A. C. B. et al. Incidence and growth of *Salmonella enterica* on the peel and pulp of avocado (*Persea americana*) and custard apple (*Annona squamosa*) // *International Journal of Food Microbiology*. 2016. (235). P. 10–16.

161. Rogers T. J. et al. Reduced virulence of an *fliC* mutant of shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 // *Infection and Immunity*. 2006. № 3 (74). P. 1962–1966.
162. Rossez Y. et al. Flagella interact with ionic plant lipids to mediate adherence of pathogenic *Escherichia coli* to fresh produce plants // *Environmental Microbiology*. 2014. № 7 (16). P. 2181–2195.
163. Rossez Y. et al. Bacterial Flagella: Twist and Stick, or Dodge across the Kingdoms // *PLoS Pathogens*. 2015. V. 11. № 1. P. 1–15.
164. Rossi E. et al. “It’s a gut feeling”–*Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment // *Critical Reviews in Microbiology*. 2018. V. 44. № 1. P. 1–30.
165. Sackmann E. K., Fulton A. L., Beebe D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research // *Nature*. 2014. V. 507. № 7491. P. 181–189.
166. Saier M. H. Microcompartments and protein machines in prokaryotes // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2013. № 4–5 (23). P. 243–269.
167. Samatey F. A. et al. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. 2001.
168. Sato K., Homma M. Multimeric structure of PomA, a component of the Na⁺-driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus* // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. № 26 (275). P. 20223–20228.
169. Scharf B. et al. Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: Importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation // *Journal of Bacteriology*. 2001. № 18 (183). P. 5334–5342.
170. Schlech W. F. Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection 2019.
171. Schwarzendahl F. J., Mazza M. G. Maximum in density heterogeneities of active swimmers // *Soft Matter*. 2018. № 23 (14). P. 4666–4678.

172. Selmeczi D. et al. Cell motility as random motion: A review 2008.P. 1–15.
173. Shum H. Microswimmer propulsion by two steadily rotating helical flagella // *Micromachines*. 2019. № 1 (10).
174. Shum H., Gaffney E. A. The effects of flagellar hook compliance on motility of monotrichous bacteria: A modeling study // *Physics of Fluids*. 2012. № 6 (24).
175. Shum H., Gaffney E. A. Hydrodynamic analysis of flagellated bacteria swimming in corners of rectangular channels // *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2015. № 6 (92).
176. Shum H., Gaffney E. A., Smith D. J. Modelling bacterial behaviour close to a no-slip plane boundary: The influence of bacterial geometry Royal Society, 2010.P. 1725–1748.
177. Sidortsov M., Morgenstern Y., Be’Er A. Role of tumbling in bacterial swarming // *Physical Review E*. 2017. № 2 (96).
178. Sokolov A. et al. Concentration dependence of the collective dynamics of swimming bacteria // *Physical Review Letters*. 2007. № 15 (98).
179. Song Y. C. et al. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion // *Molecular Microbiology*. 2004. № 2 (53). P. 541–553.
180. Sowa Y., Berry R. M. Bacterial flagellar motor // *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2008. V. 41. № 2. P. 103–132.
181. Spagnolie S. E., Lauga E. Hydrodynamics of self-propulsion near a boundary: predictions and accuracy of far-field approximations // *Journal of Fluid Mechanics*. 2012. (700). P. 105–147.
182. Stecher B. et al. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice // *Infection and Immunity*. 2004. № 7 (72). P. 4138–4150.
183. Stecher B. et al. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence // *Cellular Microbiology*. 2008. № 5 (10). P. 1166–1180.

184. Subramanian S., Kearns D. B. Functional regulators of bacterial flagella // *Annual Review of Microbiology*. 2019. V. 73. P. 225–246.
185. Swiecicki J. M., Sliusarenko O., Weibel D. B. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions // *Integrative Biology (United Kingdom)*. 2013. № 12 (5). P. 1490–1494.
186. Taktikos J., Stark H., Zaburdaev V. How the motility pattern of bacteria affects their dispersal and chemotaxis // *PLoS ONE*. 2013. № 12 (8).
187. Taylor B. L., Koshland D. E. Reversal of Flagellar Rotation in Monotrichous and Peritrichous Bacteria: Generation of Changes in Direction. 1974.
188. Terahara N. et al. Na⁺-induced structural transition of MotPS for stator assembly of the *Bacillus* flagellar motor. 2017.
189. Terashima H., Kojima S., Homma M. Chapter 2 Flagellar Motility in Bacteria. Structure and Function of Flagellar Motor // *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2008. V. 270. №C. P. 39–85.
190. Tilney L. G., Portnoy D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. // *The Journal of cell biology*. 1989. № 4 (109). P. 1597–1608.
191. Tittsler R. P., Sandholzer L. A. The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility’.
192. Tobe T., Nakanishi N., Sugimoto N. Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli* // *Infection and Immunity*. 2011. № 3 (79). P. 1016–1024.
193. Tokárová V. et al. Patterns of bacterial motility in microfluidics-confining environments // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021. № 17 (118).
194. Torres A. G., Zhou X., Kaper J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells // *Infection and Immunity*. 2005. V. 73. № 1. P. 18–29.

195. Vergara A. et al. Long Polar Fimbriae participates in the induction of neutrophils transepithelial migration across intestinal cells infected with enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014. № DEC (4).

196. Vigeant M. A. S. et al. Reversible and irreversible adhesion of motile *Escherichia coli* cells analyzed by total internal reflection aqueous fluorescence microscopy // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. № 6 (68). P. 2794–2801.

197. Visvalingam J., Ells T. C., Yang X. Impact of persistent and nonpersistent generic *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. recovered from a beef packing plant on biofilm formation by *E. coli* O157 // *Journal of Applied Microbiology*. 2017. № 6 (123). P. 1512–1521.

198. Vizsnyiczai G. et al. Light controlled 3D micromotors powered by bacteria // *Nature Communications*. 2017. (8).

199. Vladimirov N., Lebiedz D., Sourjik V. Predicted auxiliary navigation mechanism of peritrichously flagellated chemotactic bacteria // *PLoS Computational Biology*. 2010. № 3 (6).

200. Voznica J. et al. High-throughput Microscopic Analysis of *Salmonella* Invasion of Host Cells // *Analysis of Salmonella Invasion of Host Cells*. Bio-protocol. 2018. № 18 (8). P. 10.

201. Wadhwa N., Phillips R., Berg H. C. Torque-dependent remodeling of the bacterial flagellar motor // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. № 24 (116). P. 11764–11769.

202. Wang F. et al. A structural model of flagellar filament switching across multiple bacterial species // *Nature Communications*. 2017. № 1 (8).

203. Wiedemann A. et al. Involvement of c-Src tyrosine kinase upstream of class I phosphatidylinositol (PI) 3-kinases in *Salmonella enteritidis* Rck protein-mediated invasion // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. № 37 (287). P. 31148–31154.

204. Wioland H., Lushi E., Goldstein R. E. Directed collective motion of bacteria under channel confinement // *New Journal of Physics*. 2016. № 7 (18).
205. Wood T. K. et al. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. № 2 (72). P. 361–367.
206. Wortel I. M. N. et al. *Listeria* motility increases the efficiency of epithelial invasion during intestinal infection // *PLoS Pathogens*. 2022. № 12 (18).
207. Yamashita Ilchiro et al. Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction // *Nature Structural Biology*. 1998. № 2 (5). P. 125–132.
208. Yeo L. Y. et al. Microfluidic devices for bioapplications // *Small*. 2011. T. 7. № 1. P. 12–48.
209. Young G. M., Schmiel D. H., Miller V. L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: The flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. 1999.
210. Yuan D. et al. Sheathless separation of microalgae from bacteria using a simple straight channel based on viscoelastic microfluidics // *Lab on a Chip*. 2019. № 17 (19). P. 2811–2821.
211. Zhang J. et al. Fundamentals and applications of inertial microfluidics: A review // *Lab on a Chip*. 2016. V. 16. № 1. P. 10–34.
212. Zheng G. X. et al. An integrated microfluidic device for culturing and screening of *Giardia lamblia* // *Experimental Parasitology*. 2014. № 1 (137). P. 1–7.
213. Zhou M. et al. Long polar fimbriae contribute to pathogenic *Escherichia coli* infection to host cells // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. T. 103. № 18. P. 7317–7324.
214. Краткий справочник физико-химических величин под ред. Мищенко К. П., Равдель А. А., 7-е изд., Ленинград: Химия, 1974. 200 с.