

УДК 615.281.9

И.С. ЧЕРНЕЙ

ассистент кафедры биохимии и биоинформатики, магистр биологических наук¹

А.И. ЛISOVСКАЯ

студент кафедры биотехнологии¹

В.Т. ЧЕЩЕВИК, канд. биол. наук, доцент,
доцент кафедры биотехнологии¹

¹Полесский государственный университет, г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 10 апреля 2024 г.

**БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ
FILIPENDULA ULMARIA С БЕЛКОМ БИОПЛЕНКИ TASA МИКРООРГАНИЗМА
BACILLUS SUBTILIS**

В последнее десятилетие в сфере здравоохранения существует проблема образования биопленок различными микроорганизмами. Bacillus subtilis является одним из модельных микроорганизмов, способным образовывать биопленку, устойчивую к антибиотикам. В свою очередь, компоненты Filipendula ulmaria, в частности водные экстракты флавоноидов, обладают противомикробной активностью в отношении B.subtilis, что вызывает интерес в поиске белка-мишени. Используя методы биоинформатики, был проведен молекулярный докинг и анализ взаимодействия компонентов F. ulmaria в отношении белка TasA, который является ключевым фактором в формировании биопленки B. subtilis. Были выявлены молекулы с высокой аффинностью к TasA, которые могут нарушать образование биопленки, что дает основу для дальнейших исследований in vitro и in vivo. Данная работа расширяет понимание противомикробного потенциала F. ulmaria и предлагает перспективные направления в разработке новых противомикробных препаратов, направленных на ингибирование биопленок.

Ключевые слова: Filipendula ulmaria, Bacillus subtilis, молекулярный докинг, виртуальный скрининг, биопленка, белок TasA

CHERNEI I.S., Assistant of the Department of Biochemistry and Bioinformatics¹

LISOVSKAYA A.I., Student of the Department of Biotechnology,

CHESCHEVIK V.T., PhD in Biol. Sc., Associate Professor,
Associate Professor of the Department of Biotechnology¹

¹Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

**BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE INTERACTION OF FILIPENDULA
ULMARIA COMPONENTS WITH THE BIOFILM PROTEIN TASA
OF BACILLUS SUBTILIS**

Biofilm formation by various microorganisms has emerged as a significant challenge in healthcare over the past decade. Bacillus subtilis is a model microorganism known for its ability to form antibiotic-resistant biofilms. Components of Filipendula ulmaria, particularly flavonoid-rich aqueous extracts, exhibit antimicrobial activity against B. subtilis, prompting interest in identifying target proteins. Employing bioinformatic methods, we conducted molecular docking and interaction analysis of F. ulmaria components against TasA, a key protein involved in B. subtilis biofilm formation. We identified molecules with high affinity for TasA, potentially disrupting biofilm formation, providing a foundation for further in vitro and in vivo studies. This work enhances our understanding of the antimicrobial potential

of *F. ulmaria* and offers promising avenues for developing novel antimicrobial agents targeting biofilm inhibition.

Keywords: *Filipendula ulmaria*, *Bacillus subtilis*, molecular docking, virtual screening, biofilm, *TasA* protein.

Введение. Рост микроорганизмов, связанный с биопленкой, является основной проблемой с окружающей средой, промышленностью и здоровьем населения. Биопленки микроорганизмов обладают высокой устойчивостью к антибиотикам и иммунной защите хозяина. Повышенная устойчивость биопленки к традиционным методам лечения усиливает необходимость поиска и разработки новых эффективных антибиопленочных стратегий.

Ингибирование биопленки рассматривается в качестве основной лекарственной мишени для лечения различных бактериальных и грибковых инфекций. Фармакологическая разработка данных препаратов в настоящее время широко изучается. Одним из перспективных направлений является поиск соединений растительного происхождения, способных блокировать образование биопленки [1].

Исторически растительные экстракты и их биологически активные соединения были ценным источником натуральных продуктов, которые играли важную роль в профилактике и лечении различных заболеваний. Кроме того, они получили широкое признание из-за их низкого уровня токсичности и меньшего количества побочных эффектов, а также с древних времен они имеют долгую историю использования в народной медицине для лечения болезней и недомоганий. Примером лекарственного растения, способного оказывать различные терапевтические эффекты, может послужить *Filipendula ulmaria*. Лечебные свойства лабазника вязолистного, или таволги, используются людьми уже более 400 лет. Традиционно таволгу использовали как пищевое растение. Все части растения идеально подходят для сладких фруктовых блюд, а также напитков, которым она придает сладко-терпкий вкус. Чаще всего используется в бельгийской и французской кухне. Все части растения применяют для ароматизации сладкого десерта, а также напитков [2].

Лабазник вязолистный имеет разнообразный химический состав и представляет инте-

рес для медицины и фармации. Он привлекает внимание исследователей характерной биологической активностью его цветков, листьев и корней, которые являются лекарственным растительным сырьем.

Лечебные свойства лабазника определяются преимущественным действием дубильных веществ, фенольных соединений (салициловый альдегид), фенолкарбоновых кислот, катехинов, эфирных масел и многими другими компонентами [3].

В траве лабазника присутствуют флавоноиды (4,0–9,8 %): кверцетин и 5 его гликозидов (рутин, гиперозид, авикулярин, спиреозид, кверцетин-3-глюкуронид) и кемпферол-4-глюкозида. Отмечено, что спиреозид преимущественно (3,5 %) содержится в цветах и плодах, а гиперозид – в листьях. Причем общее количество флавоноидов составляет 6% в цветах, 3% в плодах и 1% в листьях и стеблях.

Лабазник вязолистный отличается богатым химическим составом, что обуславливает его разнообразные фармакологические свойства.

Противовоспалительное действие растения объясняется наличием полифенолов, таких как апигенин, кверцетин, и салициловой кислоты. Экстракты лабазника обладают высоким ДНК-протекторным потенциалом и антиоксидантными свойствами, которые связаны с содержанием комплекса полифенолов. Кроме того, им присущи цитотоксическое и иммуномодулирующее действие. Иммуномодулирующая активность связана с присутствием танинов в комплексе с другими биологически активными веществами. Эфирное масло лабазника обладает выраженной антимикробной и антифунгальной активностью. Воднометанольное извлечение из лабазника содержит различные фенольные соединения, такие как кофейная, п-кумариновая и ванилиновая кислоты, мирицетин, обладающие антибактериальной активностью. Экстракты лабазника, полученные с использованием экстрагентов с увеличивающейся полярно-

стью (ацетон, метанол и вода), проявляют антиоксидантные свойства [4].

Экстракты растения обладают широким спектром фармакологических действий: общеукрепляющим, антиканцерогенным, диуретическим, гипогликемическим, седативным, противогеморройным, антисептическим, бактериостатическим, способствующим грануляции и эпителизации.

Антимикробная активность, выраженная в виде минимальной ингибирующей концентрации, находилась в диапазоне от 2,5 до 10 мг/мл. Экстракты продемонстрировали антибактериальную активность против как грамположительных (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), так и грамотрицательных (*Proteus mirabilis*) бактерий.

Экспертиза концентраций фенолов, флавоноидов и дубильных веществ в разных частях органов растений показывает, что большее их содержание было в листьях, а между стеблем и корнем наблюдается небольшая разница концентраций. Также было установлено, что водные извлечения флаваноидов из соцветий лабазника вязолистного проявляют выраженную бактерицидную активность в отношении к *Bacillus polymixa* – 80%, *Bacillus subtilis* – 60%, *Sarcina lutea* – 50% [5].

В свою очередь, наше внимание привлекла антимикробная активность флаваноидов в отношении *Bacillus subtilis*, который служит модельным организмом для изучения регуляции биопленкообразования. Болезнетворные бактерии, такие как золотистый стафилококк, прячутся в биопленках *B. subtilis*, укрываясь от обширных методов дезинфекции. Бактериальные клетки обладают способностью образовывать биопленку на поверхности пищевых матриц и на оборудовании для пищевой промышленности, что приводит к источнику загрязнения пищевых продуктов, а впоследствии и заболеваниям человека и животных [6].

Структура биопленки регулируется как физико-химическими взаимодействиями с факторами внешней среды, так и генетическими механизмами самих бактерий. Для создания биопленки клетки переходят из планктонного состояния в иное состояние, подавляя экспрессию жгутиковых генов одновременно с повышением экспрессии генов, участвующих в производстве внеклеточного матрикса. У *B. subtilis* это переключение

происходит за счет усиления внешних сигналов, таких как истощение питательных веществ, низкий уровень кислорода или поверхностная адгезия. Сидячие клетки начинают образовывать цепи за счет подавления гидролаз клеточной стенки, и цепи заключаются в самостоятельно производимый внеклеточный матрикс, который обеспечивает жесткость и необходим для формирования прочных биопленок [7].

Жесткий внеклеточный матрикс, составляющий биопленки *B. subtilis*, содержит экзополисахариды и белки. Гены, ответственные за выработку экзополисахаридов, являются частью гена-оперона *epsA-O (eps)*. Два секретируемых белка TasA и TapA, которые кодируются трехгенным опероном *tapA-sipW-tasA* (оперон *tapA*) обеспечивают целостность структуры биопленки [8].

TasA представляет собой функциональный амилоидный белок, который синтезируется как мономер, собирается в длинные волокна (фибриллы) и транслоцируется через мембрану с участием сигнальной пептидазы SipW. Снаружи TasA с помощью белка-помощника TapA волокнами прикрепляются к клеточной стенке. Белок TasA участвует в упорядоченном созревании биопленки *Bacillus*. Его отсутствие приводит к ряду физиологических изменений, связанных со стабильностью мембран, их динамики, а также снижением жизнеспособности клеток при взаимодействии за счет отсутствия структурированного матрикса, что ограничивает возможности адаптации клеток к стрессу [9].

В настоящее время компьютерные методы прогноза биологической активности химических соединений, обозначаемые общим термином *in silico*, используются на одном из первоначальных этапов поиска новых веществ, обладающих фармакологической активностью. *In silico*-скрининг позволяет прогнозировать биологическую активность и эффективность молекул на ранних стадиях разработки. Это оптимизирует оценки *in vitro*, максимизирует их успешность и повышает общую эффективность разработки продукта. Более того, скрининг *in silico* может помочь выявить новые применения известных соединений, открывая новые возможности для репозиционирования продуктов и поиска активных ингредиентов из природных источников.

Таким образом, цель данной работы – оценить влияния компонентов лекарственного растения *Filipendula ulmaria* на белок биопленки TasA с использованием биоинформационных подходов.

Материалы и методы. Для исследования были выбраны 5 соединений из *Filipendula ulmaria*: кверцетин, рутин, кемпферол, гиперозид и спиреозид. В исследовании использовали программное обеспечение ADME online (<http://www.swissadme.ch>) для прогнозирования следующих физико-химических свойства компонентов: размер, липофильность, полярность, растворимость, а также определения фармакокинетических свойств.

В данном исследовании для проведения молекулярного докинга молекул-мишеней с лигандами применяли программные пакеты UCSF Chimera 1.11 и AutoDock Vina. 3D-структуры биоактивных соединений из *Filipendula ulmaria* были получены из онлайн-базы данных PubChem и были переведены в формат mol2 с помощью веб-ресурса OpenBabel: кверцетин (CID:5280343), рутин (CID:5280805), кемпферол (CID:5280863), гиперозид (CID:5281643) и спиреозид (CID:5320844).

Белок *Bacillus subtilis* – TasA был загружен из банка данных белков RCSB PDB (идентификатор в базе данных: 5OF2) в формате PDB.

Белок был подготовлен с использованием UCSF Chimera 1.11. Молекулы, не принадлежащие белку, были исключены. Структура файла с белком была сохранена в формате PDB. Данный программный пакет также был использован для выявления конформационных изменений в структуре белка, обусловленных взаимодействием кверцетина, кемпферола, рутина, гиперозида и спиреозида с белком TasA.

После добавления белка-мишени и лиганда в программу, была задана "коробка докинга" для белка с размером и центром связывания в каждом случае с использованием Autodock Tools, где были определены торсионные углы вращения лигандов (таблица 1). После этого, выбранные фитохимические вещества были состыкованы с рецепторными белками.

Результаты и их обсуждение. Биодоступность соединений оценивали по следующим физико-химическим параметрам: молекулярная масса, липофильность (log P), площадь полярной поверхности (TPSA) и растворимость (log S) (табл. 2).

Молекулярная масса компонентов варьировала от 286,24 г/моль до 464,38 г/моль, не превышая пределов, исключение – рутин (610,52 г/моль).

Таблица 1. – Определение области молекулярного докинга

Белок-мишень	Размер коробки (x,y,z)	Центр связывания (x,y,z)
TasA	35,8301, 36,3536, 63,5463	-9,9368, -2,92751, -23,4124
	34,365, 30,7252, 64,4166	-12,1517, -4,35152, -22,509
	53,8659, 39,2123, 65,242	-10,2325, -6,29728, -23,0366
	34,365, 35,1252, 64,38	-11,8855, -3,53604, -22,73
	35,8473, 30,945, 64,9014	-12,6267, -4,2045, -23,1584

Таблица 2. – Физико-химические свойства лигандов из *Filipendula ulmaria*

Название компонента	Размер (150-500 г\моль)	Липофильность XLOGP3 (от -0,7 до +5)	Полярность (TPSA 20-130 E ²)	Растворимость (log S не выше 6)
Кверцетин	302,24	1,54	131,36	-3,16
Рутин	610,52	-0,33	269,43	-3,30
Кемпферол	286,24	1,90	111,13	-3,31
Гиперозид	432,38	0,52	170,05	-3,66
Спиреозид	464,38	1,31	210,51	-3,64

Все молекулы являются липофильными и находились в пределах допустимых значений, что, в свою очередь, показывает высокую проходимость через клеточную мембрану.

Обнаружено, что у всех соединений площадь полярной поверхности (TPSA) превышает установленные значения: кверцетин – 131,36 E², рутин – 269,43 E², гиперозид – 170,05 E², спиреозид – 210,51 E², кроме кемпферола (111,13 E²).

Из этого следует, что данные компоненты не обладают необходимой полярностью для биодоступности. Все молекулы являются растворимыми: log S не превышала 6.

При оценке фармакокинетических свойств проводился анализ показателей коэффициента проницаемости кожи (log Kp). Чем более отрицательное логарифмическое значение, тем менее проникающей через кожу становится молекула. Также проводился анализ взаимодействия молекул с цитохромами P450 (CYP), которые играют ключевую роль в элиминации лекарств посредством метаболической биотрансформации. Ингибирование этих изоферментов приводит к токсическим и нежелательным побочным эффектам из-за накопления лекарственного средства или его метаболитов. Поэтому для разработки лекарств очень важно предсказать склонность, с которой молекула будет вызывать значительные лекарственные взаимодействия путем ингибирования CYP, и определить, какие изоформы затронуты. Параметр синтетической доступности (СД) является основным при выборе наиболее перспективных виртуальных молекул, которые будут синтезированы и подвергнуты биологическим анализам. Оценка данного параметра варьируется

от 1 до 10 (от очень легкой до очень сложной доступности) [10].

Результаты фармакокинетического анализа представлены в таблице 3.

Лучшим коэффициентом проницаемости кожи (log Kp), из выбранных компонентов, является кверцетин и кемпферол, хуже всего проницаемость наблюдалась у рутина.

При анализе взаимодействия молекул лигандов с цитохромами CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 наиболее благоприятным оказались рутин, гиперозид и спиреозид, так как они не являлись ингибиторами важнейших цитохромов.

Основываясь на показателе синтетической доступности (СД) кемпферол является наиболее перспективной виртуальной молекулой. Остальные компоненты могут потенциально быть ингибиторами одной или нескольких изоформ цитохрома P450.

Молекулярный докинг был выполнен для понимания ингибирующего механизма и режима взаимодействия выбранных фитохимических веществ с рецепторным белком. В результате анализа были получены 3D-изображения структуры комплекса белок-лиганд.

Исследования *in silico* показали, что лиганды *Filipendula ulmaria* были состыкованы с белком TasA и давали хорошую энергию связи: для кверцетина (-6,9 ккал/моль), рутина (-6,8 ккал/моль), кемпферола (-6,5 ккал/моль), гиперозида (-6,5 ккал/моль), спиреозида (-6,9 ккал/моль). Все лиганды продемонстрировали хорошее сродство к белку.

Взаимодействие белок-лиганд имело водородные связи и различные гидрофобные взаимодействия.

Таблица 3. – Фармакинетика соединений *Filipendula ulmaria*

Название компонента	log Kp (cm ² /s)	Ингибитор CYP1A2	Ингибитор CYP2C19	Ингибитор CYP2C9	Ингибитор CYP2D6	Ингибитор CYP3A4	СД
Кверцетин	-6,70	Да	Нет	Нет	Да	Да	3,21
Рутин	-10,26	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	6,52
Кемпферол	-6,70	Да	Нет	Нет	Да	Да	3,14
Гиперозид	-8,57	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	5,27
Спиреозид	-8,20	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	5,23

Результаты молекулярной стыковки TasA с лигандами представлены на рисунке ниже: кверцетином (а), рутином (б), кемпферолом (в), гиперозидом (г) и спиреозидом (д).

Прочность комплекса белка и лиганда определяется энергией лиганда в поле белка. Чем ниже энергия, тем прочнее комплекс белок-лиганд. Поэтому при анализе результатов молекулярного докинга, программа выдавала таблицу связывания компонентов из чего можно сделать вывод, что лучшими вариантами связывания для всех соединений были положения с минимальной энергией связи в первой строке из 10 вариаций.

Помимо энергии связывания скоринговая функция в AutoDock Vina присваивает благоприятные оценки, взаимодействиям водородных связей, отражая энергетически вы-

годную природу этих связей в стабилизирующих лиганд-рецепторных комплексах. И наоборот, столкновения между донорами и акцепторами водородных связей наказываются, чтобы гарантировать, что прогнозируемые конформации связывания соответствуют принципам благоприятной геометрии водородной связи [10].

Водородные связи играют решающую роль в молекулярном распознавании, опосредуя специфические взаимодействия между лигандом и его рецептором-мишенью. AutoDock Vina признает важность, как доноров, так и акцепторов водородных связей в этом процессе. В связи с чем, были определены количество водородных связей и расстояние связи между белком-мишенью и лигандом (таблица 4)

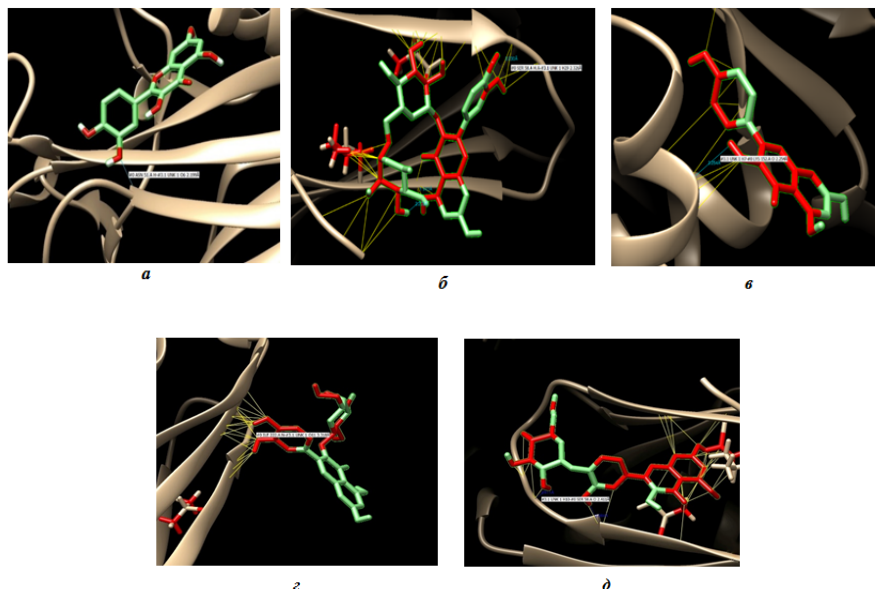


Рисунок – Взаимодействие флавоноидных соединений *Filipendula ulmaria* с белком *TasA*: а - кверцетин, б - рутином, в- кемпферолом, г-гиперозидом, д - спиреозидом

Таблица 4. – Результаты молекулярной стыковки

Белок-мишень	Название лиганда	Энергия связывания (ккал/моль)	Расстояние связи (Å)	Количество водородных связей
TasA	Кверцетин	-6,9	2,199	7
	Рутин	-6,8	2,527	25
	Кемпферол	-6,5	2,254	6
	Гиперозид	-6,5	2,669	18
	Спиреозид	-6,9	2,064	30

Из данных таблиц следует, что наилучшими показателями энергии связывания между белком и лигандом обладают кверцетин и спиреозид. Минимальное расстояние связи наблюдалось у спиреозиды, максимальное – у гиперозиды. Наибольшее число водородных связей имел спиреозид, наименьшее – кемпферол.

Заключение. В ходе исследования была определена оценка влияния компонентов лекарственного растения *Filipendula ulmaria* на белок биопленки TasA с использованием биоинформационных подходов.

Исследование *in silico*, в частности с использованием молекулярного докинга, дало представление об ингибирующих свойствах, эффективности фитохимических веществ, полученных из *Filipendula ulmaria*. Соединения продемонстрировали оптимальные показатели связывания с белком-мишенью. Кроме того, ADME-профилирование идентифицированных фитосоединений подтверждает их потенциальные свойства в качестве терапевтических препаратов с многообещающими фармакокинетическими свойствами.

Список литературы

1. Плакунов, В. К. Антибиопленочные агенты: неоднозначность терминологии и стратегии поиска / В. К. Плакунов [и др.] // Микробиология. – 2019. – №6. – С. 705-709.
2. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench / S. Samardžić [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. – 2018. – №213. – P.132–137. DOI: 10.1016/j.jep.2017.11.013
3. Gut microbiota-assisted isolation of flavonoids with a galloyl moiety from flowers of meadowsweet, *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim / D. Popowski [et al.] // Phytochem Lett. – 2019. – P. 223
4. Гудкова, Н. Ю. О перспективах интродукции представителей рода лабазник (*Filipendula* Mill.) в качестве источников лекарственного сырья / Н. Ю. Гудкова // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – №2. – С.73-79 с.
5. Соколов, Н. С. Сравнительная антимикробная активность водных извлечений из наземных органов лабазника вязолистно-

го (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) / Н.С. Соколов [и др.] // Аспирантский вестник Поволжья. – 2022. – №4.– С.63-68.

6. Биостабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации *B. subtilis* в стационарной фазе / М.Р. Шарикова [и др.] // Микробиология. – 2021. – № 1. – С. 24-42.
7. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism / C. Aguilar [et al.] // Curr. Opin. Microbiol. – 2007. –P.643.
8. Harris, K. D. Applying the handicap principle to biofilms: Condition-dependent signalling in *Bacillus subtilis* microbial communities / K. D. Harris, I. Kolodkin // Gal, Environ. Microbiol. – 2019. – P.540.
9. Kovacs, A. T. Bacterial differentiation via gradual activation of global regulators / A. T. Kovacs // Curr. Genet. – 2016. – №62. – P.128.
10. Free energy calculations to estimate ligand-binding affinities in structure-based drug design / M.R. Reddy [et al.] // Curr Pharm Des. – 2014. – P.20.

References

1. Plakunov V.K., Zhurina M.V., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Nikolaev YU.A. Antibioplenochnye agenty: neodnoznachnost' terminologii i strategii poiska [Antibiofilm agents: ambiguity of terminology and search strategies]. *Mikrobiologiya*, 2019, pp.709 (In Russian)
2. Samardžić S., Arsenijević J., Božić D., Milenković M., Tešević V., Maksimović Z. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, no. 213, pp. 132–137. DOI:10.1016/j.jep.2017.11.013
3. Popowski D., Pawłowska K.A., Piwowarski J.P., Granica S. Gut microbiota-assisted isolation of flavonoids with a galloyl moiety from flowers of meadowsweet, *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Phytochem Lett*, 2019. pp. 223.
4. Gudkova N.Y.U. O perspektivah introdukci predstavitelej roda labaznik (*Filipendula* Mill.) v kachestve istochnikov

- lekarstvennogo syr'ya [Prospect of introduction of plants from corn chandler genus (*Filipendula* Mill.), as sources of crude drug]. *Cel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2012. pp.73-79 (In Russian)
5. Sokolov N.S., Sharipova S.H., Sazanova K.N., Lyamin A.V. Sravnitel'naya antimikrobnaya aktivnost' vodnyh izvlechenij iz nadzemnyh organov labaznika vyazolistnogo (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) i labaznika shestilepnogo (*Filipendula hexapetala* Gilib.) [A comparative evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from aerial organs of meadowsweet (*Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim.) and dropwort (*Filipendula Hexapetala* gilib.)]. *Aspirantskij vestnik Povolzh'ya*, 2022, pp.63-68 (In Russian)
 6. Sharipova M.R., Mardanova A.M., Rudakova N.L., Pudova D. S Biostabil'nost' i formirovanie matriksa bioplenki kak mekhanizmy adaptacii *B. subtilis* v stacionarnoj faze [Bistability and Formation of the Biofilm Matrix as Adaptive Mechanisms during the Stationary Phase of *Bacillus subtilis*]. *Mikrobiologiya*, 2021, no.1, pp. 24-42 (In Russian)
 7. Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., Kolter R., Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, pp. 643
 8. Harris K. D., Kolodkin-Gal I., Applying the handicap principle to biofilms: Condition-dependent signalling in *Bacillus subtilis* microbial communities. *Environ. Microbiol.*, 2019, pp.540
 9. Kovacs A. T. Bacterial differentiation via gradual activation of global regulators. *Curr. Genet*, 2016, no.62, pp. 128
 10. Reddy M.R., Reddy C.R., Rathore R.S., Erion M.D., Aparoy P., Reddy R.N., Reddanna P. Free energy calculations to estimate ligand-binding affinities in structure-based drug design. *Curr Pharm Des.*, 2014, pp. 20

Received 10 April 2024