

Оценка действия полимерного соединения на процесс формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*

Р.А.Верховский¹, О.В.Нечаева², Е.И.Тихомирова²

¹ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский университет им. Н.Г.Чернышевского», Саратов, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет им. Ю.А.Гагарина», Саратов, Российская Федерация

Pseudomonas aeruginosa – один из основных возбудителей оппортунистических инфекционных заболеваний человека, особенно часто встречающихся у иммунокомпрометированных пациентов. Это связано со способностью бактерии к формированию микробных биопленок на биотических и инертных поверхностях предметов обихода, госпитальной среды и изделий медицинского назначения, что приводит к формированию множественной устойчивости возбудителя к широкому спектру антимикробных препаратов. В связи с этим разработка методов, препятствующих процессам пленкообразования *P. aeruginosa*, является актуальным направлением биомедицины.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода, ПААГ-М, РЭМ

Для цитирования: Верховский Р.А., Нецаева О.В., Тихомирова Е.И. Оценка действия полимерного соединения на процесс формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2018; 3(1): 63–66. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-63-66

Evaluation of the action of polymer connection on the process of formation of microbial biofiles by *Pseudomonas aeruginosa*

R.A.Verkhovsky¹, O.V.Nechaeva², E.I.Tikhomirova²

¹N.G.Chernyshevsky Saratov National Research University, Saratov, Russian Federation;

²Yuri Gagarin State Technical University, Saratov, Russian Federation

Pseudomonas aeruginosa is one of the main pathogens of opportunistic human infectious diseases, especially common in immunosuppressed patient. This occurs due to its ability to form microbial biofilms on the biotic and inert surfaces of household items, hospital environment and medical products, which cause pathogen's resistance to a wide range of antimicrobial agents. Hence, the development of methods that hamper the film-forming processes of *P. aeruginosa* is an actual direction of biomedicine.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, polyazolidine ammonium, modified by iodine hydrate ions, PAAG-M, SEM

For citation: Verkhovsky R.A., Nechaeva O.V., Tikhomirova E.I. Evaluation of the action of polymer connection on the process of formation of microbial biofiles by *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriology. 2018; 3(1): 63–66. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-63-66

Р. *aeruginosa* может являться ассоциантом нормальной микрофлоры ряда биотопов организма человека и вызывать оппортунистические инфекционные заболевания различной локализации, которые могут протекать как в острой, так и в хронической форме [1, 2].

В процессе эволюции клетки *P. aeruginosa* приобрели целый комплекс защитных механизмов, что значительно за-

трудняет лечение вызванных ими заболеваний. В составе генома *P. aeruginosa* закодированы ферменты, обуславливающие резистентность возбудителя к антибиотикам ряда бета-лактамов, аминогликозидов и макролидов [2]. Помимо этого, *P. aeruginosa* благодаря жгутикам, пиялам IV типа и растворимым продуктам жизнедеятельности, образующим внеклеточный матрикс, способна формировать биопленки.

Для корреспонденции:

Верховский Роман Аркадьевич, аспирант кафедры «Экология» ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский университет им. Н.Г.Чернышевского»

Адрес: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83
E-mail: r.a.verhovskiy@mail.ru

Статья поступила 18.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Roman A. Verkhovsky, graduate student of the department «Ecology», N.G.Chernyshevsky Saratov National Research University

Address: 83 Astrakhanskaya str., Saratov, 410012, Russian Federation
E-mail: r.a.verhovskiy@mail.ru

The article was received 18.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Жгутики, придающие подвижность бактериальным клеткам, способствуют образованию поверхностного монослоя биопленки, а благодаря пилсам – и микроколоний на ней [3]. Одним из основных компонентов биопленки являются полисахариды. Окружая себя полисахаридным матриксом, бактериальные клетки маскируют свои антигены, тем самым делая себя невидимыми для компонентов иммунной системы человека [4]. Кроме того, экзополисахариды, входящие в состав биопленки, затрудняют диффузию антибактериальных препаратов и предохраняют бактериальные клетки от негативных воздействий окружающей среды [5].

Биопленки, образуемые *P. aeruginosa*, могут быть плоскими (недифференцированными) либо структурными (дифференцированными). Формирование недифференцированной биопленки происходит путем образования плотного слоя сливающихся клеток [6]. Процесс формирования дифференцированной биопленки начинается с возникновения поверхностных агрегатов и может приводить либо к формированию небольших колоний микроорганизмов, состоящих из подвижной и неподвижной субпопуляций бактериальных клеток, либо к формированию более крупных микроколоний, возникших в ходе клонального роста агрегатов [7].

В связи с этим разработка мер по предотвращению формирования микробных биопленок на инертных поверхностях изделий медицинского назначения является актуальной проблемой биомедицины. Начальным этапом в процессе формирования биопленок является неспецифическая адгезия бактериальных клеток на поверхности субстрата, которая происходит в первые несколько часов культивирования микроорганизмов [8]. Применение биосовместимых полимерных соединений, способных изменять поверхностные свойства субстрата, делая его непригодным для адгезии бактериальных клеток, является перспективным в борьбе с микробными биопленками.

Целью данного исследования являлось изучение действия полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на процесс формирования микробных биопленок штаммами *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

В работе использовали стандартный и клинический штаммы *P. aeruginosa*. Объектом исследования явилось биосовместимое полимерное соединение – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М), производства ООО НПО «Константа» (Россия), для которого ранее были установлены широкий спектр антимикробной активности и низкий уровень токсичности [9–11].

Количественный учет интенсивности пленкообразования проводили по величине связывания микробными биопленками красителя кристаллического фиолетового (ед. OD) [12]. Для этого взвесь исследуемых микроорганизмов с начальной концентрацией клеток 10^5 КОЕ/мл вносили по 100 мкл в ячейки 96-луночных плоскодонных полистирольных планшетов, содержащих в каждой лунке ряда по 100 мкл мясопептонного бульона (МПБ).

Штаммы *P. aeruginosa* культивировали при температуре 37°C в течение 24, 48, 72 и 96 ч. После соответствующей экспозиции планктонные формы клеток удаляли, ячейки

планшетов аккуратно промывали стерильной водой и вносили в них по 100 мкл 1%-ного водного раствора кристаллического фиолетового. Через 10 минут краситель удаляли, а лунки трижды аккуратно промывали. Краситель, связанный с биопленками, растворяли в смеси 1÷4 ацетон/этанол и определяли оптическую плотность на спектрофотометре для микропланшетов Epoch «BioTek» (США) при длине волны 420 нм. Контрольные лунки содержали ацетон-этаноловую смесь.

Для формирования микробных биопленок на поверхности катетера его фрагменты помещали в МПБ, содержащий суточные культуры исследуемых штаммов *P. aeruginosa* в концентрации 2×10^5 м.к./мл. Опытные образцы катетера предварительно обрабатывали 0,5%-ным раствором ПААГ-М. Культивирование образцов проводили при температуре 37°C в течение суток, после чего оценивали процесс пленкообразования с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Электронно-микроскопическое исследование микробных биопленок на поверхности фрагментов уретрального катетера как модели изделий медицинского назначения проводили с использованием растрового электронного микроскопа Aspex Explorer (FEI Company, США). На поверхность образцов напыляли токопроводящую пленку золота. Микроскопию проводили при ускоряющем напряжении 20 kV, ток эмиссии – 50 μ A. Изображение получали во вторичных электронах.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ STATISTICA 6,0.

Результаты и обсуждение

Оценка пленкообразующей способности *P. aeruginosa* позволила установить, что интенсивность связывания красителя стандартными штаммами была в 1,66 раза выше по сравнению с клиническими штаммами (рис. 1).

Обработка лунок иммунологического планшета исследуемым полимерным соединением способствовала нарушению формирования микробных биопленок, что выражалось в снижении интенсивности связывания кристаллического фиолетового стандартным штаммом в 7 раз, а клиническим – в 4,17 раза (критерий Вилкоксона $Z = 2,02$, $p < 0,05$).

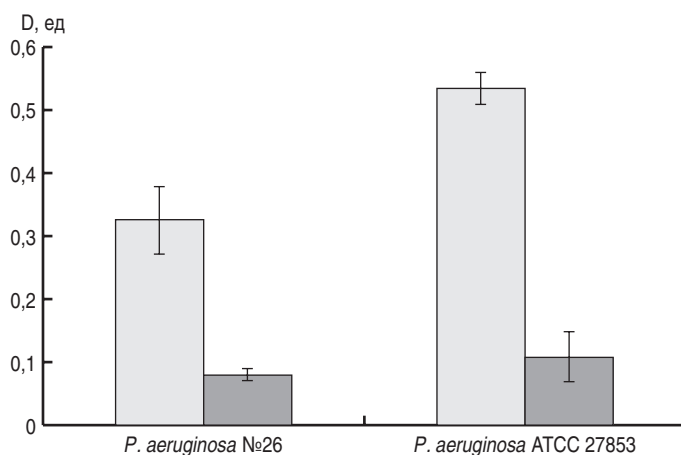


Рис. 1. Влияние ПААГ-М на процесс формирования микробных биопленок стандартным и клиническим штаммами *P. aeruginosa*.

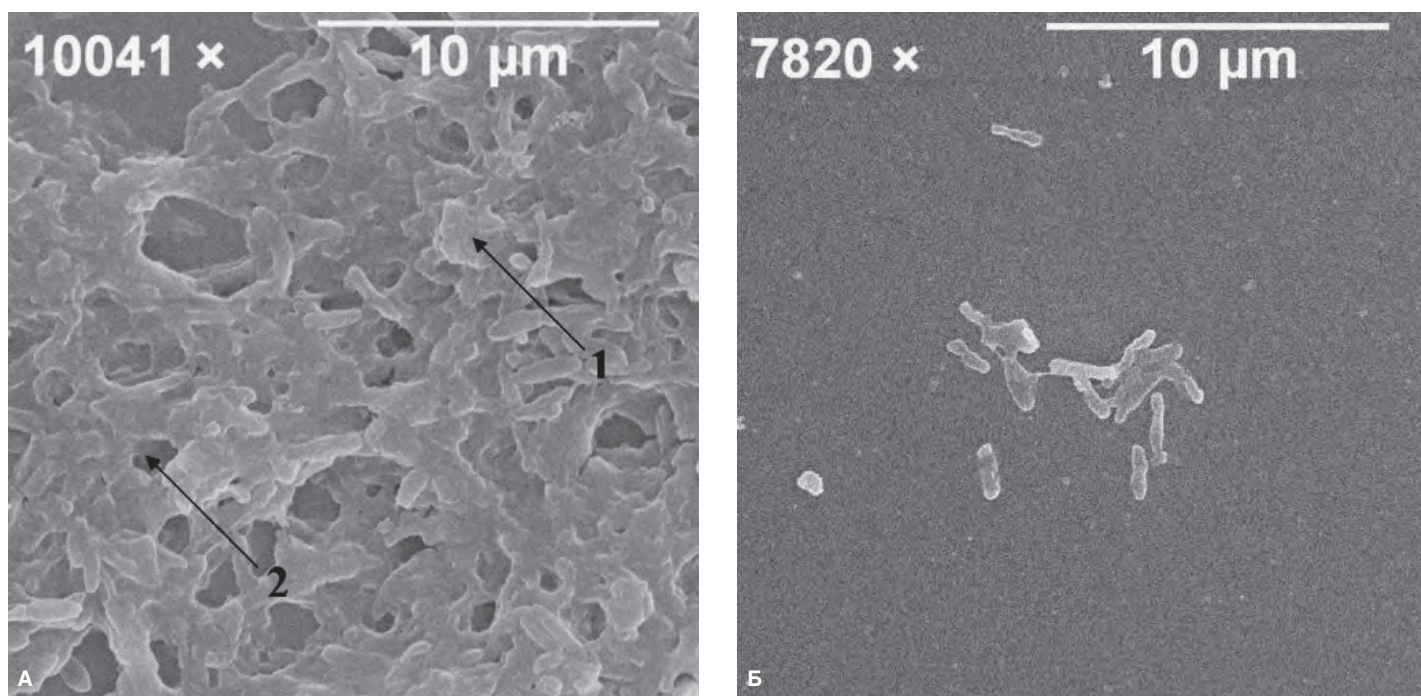


Рис. 2. Электронная микрофотография микробной биопленки клинического штамма *P. aeruginosa* №26 на поверхности уретрального катетера: А – контроль: 1 – экзополимерный матрикс; 2 – каналы биопленки; Б – после обработки ПААГ-М.

Поскольку развитие катетер-ассоциированных инфекций связано с формированием микробных биопленок на поверхности изделий медицинского назначения при проведении инвазивных манипуляций, для дальнейших исследований был выбран полиуретановый уретральный катетер, на фрагментах которого в условиях *in vitro* формировали микробные биопленки. Было установлено, что через 24 ч культивирования микробные биопленки, образованные как стандартным, так и клиническим штаммами *P. aeruginosa*, имели сложную трехмерную структуру: бактерии в них формировали многоклеточные слои, покрытые интенсивно выраженным экзополимерным матриксом (рис. 2). В массиве биопленки отмечалось наличие большого количества каналов, через которые осуществляется транспорт питательных веществ, продуктов метаболизма и сигнальных молекул.

На рисунке 2А представлена электронная микрофотография микробной биопленки, образованной клиническим штаммом *P. aeruginosa* №26. В контрольном образце клетки имели размеры, соответствующие их исходным характеристикам, визуализировался интенсивный экзополимерный матрикс, в который были погружены микробные клетки. Через 24 ч культивирования формирование микробной биопленки происходило на всей поверхности образца.

Обработка образцов уретрального катетера сублетальными концентрациями ПААГ-М способствовала нарушению процесса адгезии микробных клеток на его поверхности: отмечали изолированные скопления микробных клеток, расположенные в один слой, размер клеток был в 1,5 раза меньше по сравнению с контрольными (рис. 2Б). Кроме того, наблюдалось практически полное отсутствие экзополимерного матрикса.

С использованием методов спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии установлено достоверное нарушение процесса пленкообразования стандартным и

клиническим штаммами *P. aeruginosa* при обработке инертных поверхностей лунок иммунологического планшета и образцов уретрального катетера сублетальными концентрациями полимерного соединения ПААГ-М.

Мы предполагаем, что положительно заряженный ПААГ-М способен электростатически связываться с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеточной стенки бактерии, тем самым не позволяя им нормально функционировать. Согласно литературным данным, некоторые поверхностные структуры *P. aeruginosa*, такие как пили и жгутики, а также вырабатываемая бактериальными клетками внеклеточная слизь принимают активное участие в процессе пленкообразования. При нарушении их функции можно ожидать снижения активности пленкообразования. Также ПААГ-М, возможно, способен изменять поверхностные свойства субстрата, тем самым нарушая этап неспецифической адгезии и препятствуя образованию первичных поверхностных агрегатов, необходимых для формирования полноценной биопленки.

Полученные в ходе исследования результаты позволяют рекомендовать ПААГ-М для предварительной обработки изделий медицинского назначения и объектов госпитальной среды с целью предотвращения формирования микробных биопленок.

Литература

1. Bjarnsholt T. Biofilm infections. Springer. 2011, 314 p.
2. Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypic screening of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012 Jun 30;25(2):78-81.
3. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008 Aug;21(4):595-9. DOI: 10.1016/j.pupt.2007.12.001.

4. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoïd exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol*. 1995 Aug 15;155(4):2029-38.
5. Маянский АН, Чеботарь ИВ. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011;1:101-8.
6. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol*. 2003 Oct;50(1):61-8.
7. Klausen M, Gjermansen M, Kreft JU, Tolker-Nielsen T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Aug;261(1):1-11. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x
8. Lebeaux D, Chauhan L, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*. 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
9. Нечаева ОВ, Веденева НВ, Вакараева ММ, и др. Комплексная оценка токсичности полимерного соединения, обладающего антимикробной активностью. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2016;16(2):160-4. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-160-164
10. Шуршалова НФ, Миндибекова ДЕ, Заярский ДА, Нечаева ОВ. Изучение антибактериальной активности новых препаратов на основе модифицированного биосовместимого полимера. Сборник: Наука и образование в жизни современного общества сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции в 14 томах. 2015, с. 156-159.
11. Нечаева ОВ, Ульянов ВЮ, Заярский ДА, Тихомирова ЕИ, Вакараева ММ. Влияние биосовместимого полимерного соединения на выживаемость возбудителей инвазивных микозов. *Проблемы медицинской микологии*. 2014; 16(2):106.
12. Тец ВВ. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. СПб.: КЛЕ Т, 2006, 128 с.
5. Mayansky AN, Chebotar IV. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;1: 101-8. (In Russian).
6. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol*. 2003 Oct;50(1):61-8.
7. Klausen M, Gjermansen M, Kreft JU, Tolker-Nielsen T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Aug;261(1):1-11. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x
8. Lebeaux D, Chauhan L, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*. 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
9. Nechaeva OV, Vedeneva NV, Vakaraeva MM, Tikhomirova EI, Shurshalova NF, Zayarskiy DA, et al. Complex Assessment of Toxicity of the Polymeric Connection Possessing Antimicrobial Activity. *Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2016;16(2):160-4. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-160-164 (In Russian).
10. Shurshalova NF, Mindibekova DE, Zayarskii DA, Nechaeva OV. Izuchenie antibakterial'noi aktivnosti novykh preparatov na osnove modifitsirovannogo biosovmestimogo polimera. *Sbornik: Nauka i obrazovanie v zhizni sovremennogo obshchestva sbornik nauchnykh trudov po materialam Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii v 14 tomakh*. 2015, pp. 156-159. (In Russian).
11. Nechaeva OV, Ul'yanov VYu, Zayarskii DA, Tikhomirova EI, Vakaraeva MM. Vliyanie biosovmestimogo polimernogo soedineniya na vyzhivaemost' vozбудitelei invazivnykh mikofov. *Problems in Medical Mycology*. 2014;16(2):106. (In Russian).
12. Tets VV. Mikroorganizmy i antibiotiki. Infektsii kozhi, myagkikh tkanei, kostei i sustavov. St. Petersburg, 2006, 128 p. (In Russian).

References

Информация о соавторах:

Нечаева Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Экология» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет им. Ю.А.Гагарина»
 Адрес: 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77
 Телефон: (8452) 99-8530
 E-mail: olaav.nechaeva@rambler.ru

Тихомирова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой «Экология», ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет им. Ю.А.Гагарина»
 Адрес: 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77
 Телефон: (8452) 99-85-30
 E-mail: tichomirova ei@mail.ru

Information about co-authors:

Olga V. Nechaeva, PhD (Biol.), associate professor of the department "Ecology", Yuri Gagarin State Technical University, Saratov, Russian Federation
 Address: 77 Politekhnikeskaya str., Saratov, 410054, Russian Federation
 Phone: (8452) 99-8530
 E-mail: olaav.nechaeva@rambler.ru

Elena I. Tikhomirova, Dr. Sci. (Biol.), professor, head of the department of ecology, Yuri Gagarin State Technical University
 Address: 77 Politekhnikeskaya str., Saratov, 410054, Russian Federation
 Phone: (8452) 99-8530
 E-mail: tichomirova ei@mail.ru