

Воздействие дезинфицирующих веществ на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*: чувствительность и адаптация

В.В.Кузин, Н.В.Колупаева, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, И.А.Дятлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – оппортунистический патоген, вызывающий широкий спектр внутри- и внебольничных инфекций. Рост числа заболеваний обусловлен распространением антибиотикорезистентных штаммов возбудителя. Одной из причин устойчивости данного патогена к антибактериальным препаратам является его способность образовывать биопленки. Развитию и распространению синегнойной инфекции способствует неграмотный подбор антибактериальных препаратов при лечении и некачественная дезинфекция при проведении профилактических мероприятий. В работе приведен перечень дезинфицирующих веществ и определены эффективные режимы их применения для разрушения биопленок *P. aeruginosa*. Описано комплексное применение дезинфектантов совместно с факторами разрушения матрикса. Изучен транскрипционный ответ клеток *P. aeruginosa* в биопленке на воздействие дезинфицирующих веществ.

Ключевые слова: биопленка *Pseudomonas aeruginosa*, дезинфицирующие вещества, стресс, гены, экспрессия, ферменты

Для цитирования: Кузин В.В., Колупаева Н.В., Щербакова О.А., Колупаева Л.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Дятлов И.А. Воздействие дезинфицирующих веществ на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*: чувствительность и адаптация. Бактериология. 2023; 8(4): 28–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-28-35

Effects of disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: sensitivity and adaptation

V.V.Kuzin, N.V.Kolupaeva, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen causing a wide range of hospital-acquired and nosocomial infections. The increase in the number of diseases is due to the spread of antibiotic-resistant strains of *P. aeruginosa*. One of the reasons for the resistance of this pathogen to antibacterial drugs is its ability to form biofilms. Illiterate selection of antibacterial drugs during treatment and poor quality disinfection during prophylactic measures contribute to the development and spread of *P. aeruginosa* infection. The paper provides a list of disinfectants and determines effective modes of their use to destroy *P. aeruginosa* biofilms. The complex application of disinfectants together with matrix disruption factors is described. The transcriptional response of *P. aeruginosa* cells in the biofilm to the effect of disinfectants was studied.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, disinfectants, stress, genes, expression, enzymes

For citation: Kuzin V.V., Kolupaeva N.V., Shcherbakova O.A., Kolupaeva L.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Dyatlov I.A. Effects of disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: sensitivity and adaptation. Bacteriology. 2023; 8(4): 28–35. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-28-35

P*seudomonas aeruginosa* – условно-патогенный микроорганизм, входящий в группу наиболее опасных патогенов ESKAPE. Бактерия является причиной возникновения широкого спектра острых инфекций, таких как внутрибольничная пневмония, ожоговые и раневые инфекции, а также может быть причиной хронической инфекции у пациентов с

муковисцидозом [1–7]. Быстрое распространение и высокая смертность от заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*, обусловлена большим набором факторов вирулентности, высокой природной резистентностью, а также способностью этих бактерий образовывать биопленки. Синегнойная палочка является четвертым по частоте встречаемости патогеном,

Для корреспонденции:

Кузин Виктор Владимирович, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182

Статья поступила 25.10.2023, принята к печати 26.12.2023

For correspondence:

Viktor V. Kuzin, Researcher of the Department for training and improvement of specialists of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB Bld. 24 «Quarter A» Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182

The article was received 25.10.2023, accepted for publication 26.12.2023

вызывающим около 8% хронических раневых инфекций, и седьмым по значимости, вызывающим до 6% инфекций кровотока [8].

В 2017 г. *P. aeruginosa* была признана Всемирной организацией здравоохранения одной из наиболее опасных для жизни инфекций и включена в список приоритетных патогенов для исследований и разработки новых антибиотиков [9]. Высокая резистентность к большинству противомикробных препаратов (антибиотики, биоциды и дезинфектанты) обусловлена ограниченной проницаемостью внешней мембраны, наличием эффлюксных насосов, которые выкачивают биоциды из клетки, выработкой ферментов, инактивирующих антибиотики, способностью образовывать биопленки [10–12].

Не менее важной проблемой является распространение данного патогена во внебольничной среде: пищевой и косметической промышленности, социальной и бытовой сфере.

В настоящее время основными направлениями в борьбе с биопленками являются: поиск антиадгезивных материалов, применение дезинфицирующих средств, разрушающих матрикс биопленки, комбинированное воздействие антибактериальных веществ и факторов, разрушающих матрикс, разработка соединений, подавляющих чувство кворума, поиск и конструирование генно-инженерных фагов. Из перечисленных вариантов применение дезинфицирующих средств остается наиболее дешевым, эффективным и простым методом.

Некачественная дезинфекция может стать причиной распространения биологических пленок на медицинских изделиях (катетерах, искусственных суставах, механических клапанах сердца и пр.) и других поверхностях в лечебно-профилактических учреждениях, что может приводить к распространению острых и хронических инфекций у пациентов.

Известно, что процессы формирования биологических пленок контролируются большим количеством генов [13]. Однако транскрипционный ответ генов, участвующих в формировании биопленки *P. aeruginosa*, при действии химических и биологических веществ подробно не изучен. Понимание того, как различные антимикробные агенты влияют на экспрессию генов, играющих роль в образовании биологических пленок, может привести к разработке новых препаратов и стратегий их применения.

Целью данного исследования являлось определение минимальных концентраций дезинфицирующих веществ, эффективных для разрушения биопленок *P. aeruginosa*, и исследование изменения уровней экспрессии генов биопленкообразования в условиях стресса.

Материалы и методы

Антибактериальные препараты

Использовали 11 химических дезинфицирующих веществ (ДВ) различных функциональных классов, таких как катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ): бензалкония хлорид (четвертичное аммониевое соединение (ЧАС)), N,N-бис(3-аминопропил)-додециламин (третичный амин), полигексаметиленгуанидин (ПГМГ); кислородоактивные соединения: перекись водорода, диоксид хлора; хлорактивные соединения (дихлоризоциануровая кислота (ДХЦК), гипохлорит натрия, нейтральный анолит, хлоргексидина гидрохлорид); альдегиды (глутаровый и ортофталевый). Для разрушения

матрикса использовали ферменты класса гидролаз (протеаза, липаза, моноаза) и ион-коагулянты (трилоны А и Б).

Штаммы микроорганизмов

В работе использовали клинические изоляты *P. aeruginosa*, выделенные в 2017–2020 гг. от пациентов НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н.Бурденко ($n = 37$). В качестве референс-штамма использовали лабораторный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» и рекомендованный руководством Р 4.2.3676-2020 для тестирования дезинфицирующих средств [14].

Определение способности штаммов *P. aeruginosa* к образованию биопленок

Эффективность образования бактериальных биопленок исследуемых штаммов *P. aeruginosa* определяли методом окраски красителем кристаллическим фиолетовым биопленки, сформированной на стенках 96-луночного планшета [15]. Для получения биологических пленок культуры выращивали до стационарной фазы, вносили в лунки планшета и инкубировали при температуре 37°C в течение 3–5 суток. Для получения достоверных результатов использовали не менее 4–5 лунок на один опытный образец. Образовавшиеся биопленки окрашивали и проводили количественный учет связанного красителя спектрофотометрически.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Суспензию клеток *P. aeruginosa* засеивали в чашки Петри с плотной питательной средой, выращивали в течение 6, 12, 24 и 48 ч, моделируя различные фазы формирования биопленки. На поверхность сформированных биопленок с помощью пинцета помещали стерильный аппликатор из пластика размером 10 × 10 мм на 3 мин. Для окрашивания матрикса аппликаторы помещали в 8-луночный планшет, вносили краситель TOTO-1 (Thermo, США) и оставляли на 15 мин в темноте. Далее отбирали раствор первого красителя и добавляли краситель SYTO 60 red (Thermo, США) для окрашивания живых клеток. Через 15 мин образцы отмывали и фиксировали 0,25%-м раствором глутарового альдегида [16]. Визуализацию образцов проводили с помощью конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония) с масляной иммерсией при увеличении объектива 60× (объектив UPLXAP060XO 60.0X/1.518 Oil, N/A 1,42, U-DIC60). Для визуализации использовали диодные лазеры с длиной волны излучения 488 и 561 нм для окрашенных SYTO 9 и SYTO 60 red образцов соответственно. Мощность лазеров составляла 10% от максимальной. Анализ образцов слепым методом и получение трехмерных изображений проводили с интервалом по оси Z 0,36 мкм. Результаты анализировали в программе LSM Image Browser (NIH, США) с использованием плагинов Bio-formats и Comstat2 (Университет Копенгагена, Дания).

Определение эффективности применения дезинфицирующих веществ для разрушения планктонных клеток и биопленок *P. aeruginosa*

Режимы применения ДВ для разрушения планктонных клеток и биопленок *P. aeruginosa* определяли методом аппликаторов [17]. Аппликаторы с отпечатком культуры, выращенной

Таблица 1. Режим амплификации РВ-ПЦР с флуоресцентной детекцией в присутствии SYBR Green I
Table 1. RT-PCR amplification mode with fluorescent detection in the presence of SYBR Green I

Этап реакции / Reaction stage	Описание / Description	Температурно-временной режим / Temperature-time regime	Количество циклов / The number of cycles
1	Начальная денатурация / Initial denaturation	+95°C – 5 мин	1
2	Денатурация / Denaturation	+95°C – 20 с	39
	Отжиг / Annealing	+61°C – 20 с*	
	Элонгация / Elongation	+72°C – 30 с	
3	Считывание флуоресцентного сигнала / Reading the fluorescent signal	+65...+95°C – 5 с (каждую секунду повышается на 0,5°C) / +65...+95°C – 5 sec (every second increases by 0.5°C)	1
4	Хранение / Storage	+10°C	1

Таблица 2. Праймеры, используемые в исследовании
Table 2. Primers used in the study

Ген / Gene	F/R	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3') / Oligonucleotide sequence (5'→3')	Размер ПЦР- продукта, п.н. / Size of PCR product, bp	Источник / Reference
16s	F	CTGCCTGGTAGTGGGGGATA	149	[19]
	R	GTCGCCTTGGTAGGCCCTTTA		
algR	F	CCGACCACAAGTACGTGACC	195	[20]
	R	CGTCGAGGCCTTTCAGGTAG		
gyrB	F	ATCTCGGTGAAGGTACCGGA	139	[21]
	R	TGGCTTCGTTGGGATTCTCC		
oprL	F	CCCGCGAGTACAATATGGCT	122	[22]
	R	GACCGGACGCTCTTTACCAT		
siaB	F	ATCCTGCTCTGCTCAACGG	170	[23]
	R	CCCTTGAGGTTGGCGTAGTG1		

в течение 6 ч (планктонная форма) или 48 ч (био пленка), помещали в раствор ДВ на 30 мин. Для оценки комплексного воздействия дезинфицирующих веществ и соединений, разрушающих матрикс, био пленки предварительно обрабатывали раствором ферментов и ион-коагулянтов в течение 5 мин. После обработки аппликаторы переносили в пробирки с жидкой питательной средой и культивировали при температуре 37°C в течение 3–5 суток. Эффективность обработки оценивали по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

Измерение уровней экспрессии генов *P. aeruginosa* при воздействии дезинфицирующих веществ

После выдержки аппликатора с отпечатком био пленки в растворе ДВ проводили трехкратную отмывку проб в стерильном буфере PBS и выделение нуклеиновых кислот методом фенол-хлороформной экстракции с помощью набора РНК-экстран («Синтол», Москва, Россия). Для очистки проб от остатков геномной ДНК полученную смесь обрабатывали TurboDNase. Отсутствие ДНК контролировали при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) и электрофореза. Синтез кДНК осуществляли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Уровень представленности транскриптов изучаемых генов оценивали при помощи РВ-ПЦР в присутствии интеркалятора SYBR. Амплификацию проводили по режиму, указанному в табл. 1, с использованием специфических праймеров (табл. 2). Статистическую обработку данных проводили по методу Pfaffl [18].

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка интенсивности био пленкообразования штаммов *P. aeruginosa*

Анализ величин относительных показателей плотности био пленок, сформированных *P. aeruginosa* ($n = 37$), выявил, что все исследуемые штаммы обладали способностью образовывать био пленки. По этому показателю они были разделены на три категории: с высокой интенсивностью образования био пленки – 84% ($n = 31$), средней – 11% ($n = 4$) и низкой – 5% ($n = 2$). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными [24]. Для исследований были выбраны лабораторный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 и три клинических штамма *P. aeruginosa* (B2616p/20, F19-4Pa/19, B70p/19) с самой высокой интенсивностью био пленкообразования.

Чувствительность бактериальных пленок к дезинфицирующим веществам

Чувствительность био пленок вышеуказанных штаммов к воздействию ДВ определяли по методу O'Toole [15], предварительно обрабатывая лунки планшета со сформированной био пленкой растворами ДВ.

Таблица 3. Чувствительность био пленок *P. aeruginosa* к биоцидам
Table 3. Sensitivity of *P. aeruginosa* biofilms to biocides

Штаммы / Strains	ДВ / DS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>P. aeruginosa</i> B2616p/20	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> B70p/19	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> F19-4p.a./19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1 – ЧАС 0,5%; 2 – ПГМГ 0,4%; 3 – триамин 0,1%; 4 – перекись водорода 3%; 5 – диоксид хлора 0,05%; 6 – хлоргексидин 0,5%; 7 – гипохлорит натрия 0,1%; 8 – ДХЦК 0,015% по активному хлору (АХ); 9 – нейтральный анолит 0,03% (по АХ); 10 – глутаровый альдегид 1,0%; 11 – ортофталевый альдегид 0,3%; «-» – штамм чувствителен к дезинфектанту; «+» – штамм не чувствителен к дезинфектанту.
1 – QAC 0.5%; 2 – PHMG 0.4%; 3 – triamine 0.1%; 4 – hydrogen peroxide 3%; 5 – chlorine dioxide 0.05%; 6 – chlorhexidine 0.5%; 7 – sodium hypochlorite 0.1%; 8 – ДХЦК 0.015% for active chlorine (AC); 9 – neutral anolyte 0.03% (according to AC); 10 – glutaraldehyde 1.0%; 11 – orthophthalic aldehyde 0.3%; “-” – the strain is sensitive to the disinfectant; “+” – the strain is not sensitive to the disinfectant.

Таблица 4. Режимы применения дезинфектантов для разрушения биопленок *P. aeruginosa*
 Table 4. Regimes for using disinfectants to destroy *P. aeruginosa* biofilms

Действующее вещество / Active ingredient	Концентрация раствора по действующему веществу, % / Concentration of solution according to active ingredient, %			
	Планктонная культура / Planktonic culture	Биопленка / Biofilm	Биопленка (с разрушенным матриксом) / Biofilm (with destroyed matrix)	
ЧАС / QAC	0,05	1,0	0,2 (П Л М)	0,1 (ТБ)
ПГМГ / PHMG	0,03	0,8	0,5 (М)	0,1 (ТБ)
Третичный амин / Tertiary amine	0,01	0,5	0,07 (Л М)	0,03 (ТБ)
Перекись водорода / Hydrogen peroxide	2,0	5,0	2,0 (М)	3,0 (ТБ)
Диоксид хлора / Chlorine dioxide	0,02	0,1	0,02 (М)	0,05 (ТБ)
Хлоргексидин / Chlorhexidine	0,05	1,0	0,1 (М)	0,1 (ТБ)
Гипохлорит натрия / Sodium hypochlorite	0,075	0,2	0,1 (М)	0,1 (ТБ)
ДХЦК (по АХ) / SDIC (by АС)	0,0075	0,03	0,015 (П Л М)	0,0075 (ТА)
Нейтральный анилит (по АХ) / Neutral anolyte (by АС)	0,02	0,05	0,04 (П Л М)	0,04 (ТА ТБ)
Глутаровый альдегид / Glutaraldehyde	0,25	2,5	1,0 (П Л М)	0,5 (ТБ)
Ортофталевый альдегид / Orthophthalic aldehyde	0,1	0,6	0,1 (М)	0,1 (ТБ)

ДХЦК – дихлоризоцианурат натрия; П – протеаза, 1%; Л – липаза, 1%; М – маннанназа, 1%; ТА – Трилон А, 1%; ТБ – Трилон Б, 1%. / P – protease, 1%; L – lipase, 1%; M – mannanase, 1%; TA – Trilon A, 1%; TB – Trilon B, 1%.

Основываясь на показателях оптической плотности (OD590), можно сделать вывод о том, что штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* F19-4p.a./19 были наиболее устойчивыми к большинству исследуемых ДВ (табл. 3), при этом последний обладал резистентностью ко всему перечню тестируемых биоцидов.

Для определения эффективных режимов применения ДВ использовали метод аппликаторов, который позволяет проводить прямую оценку выживаемости бактерий в составе биопленок. Исследования проводили на двух наиболее устойчивых штаммах, указанных выше.

Показано, что бактерии *P. aeruginosa* в планктонном состоянии более чувствительны ко всем тестируемым ДВ, чем в форме биопленки. Для всех исследованных веществ отмечено увеличение минимальной бактерицидной концентрации (МБК), необходимой для разрушения биопленки относительно планктонной культуры. Например, при применении перекиси водорода была выявлена разница в концентрациях в 2,5 раза, для хлорактивных соединений – в 3–5 раз, альдегидов – в 6–10 раз (табл. 4). Существенные различия в МБК наблюдались при использовании ЧАС и ПГМГ – в 20 и 27 раз соответственно. Наибольшая разница была отмечена для третичного амина – до 50 раз. Результаты исследования согласуются с данными, опубликованными ранее [25]. Такое значительное увеличение разницы значений МБК связано с наличием экзополисахаридного матрикса, препятствующего проникновению биоцидов внутрь биопленки [26]. Эффективным методом снижения рабочих концентраций является разрушение матрикса при помощи активных по отношению к нему веществ, таких как ферменты класса гидролаз и ион-коагулянты.

Предварительная обработка биопленок исследуемых штаммов *P. aeruginosa* 1%-ми растворами гидролитических ферментов (протеаза, липаза, маннанназа) и ион-коагулянтов (Трилон А, Трилон Б) позволила значительно снизить МБК тестируемых дезинфицирующих веществ. Было отмечено, что разница значений МБК для планктонных клеток и

биопленок снижается до 2–3 раз для катионных ПАВ и до двух и менее раз для хлорактивных, кислородоактивных соединений и альдегидов. В некоторых случаях значения МБК для планктонной и биопленочной формы совпадали.

Установлено, что самым активным ферментом была маннанназа, что обусловлено ее воздействием, направленным на разрушение β -1,4-гликозидной связи в полисахаридах [27]. Применение маннанназы совместно с кислородоактивными соединениями позволило снизить значения МБК биопленок до значений МБК планктонных клеток.

Среди ион-коагулянтов Трилон Б проявлял наибольшую активность при разрушении экзополисахаридного матрикса, что также показано в исследовании Bakht M. [28]. Максимальная эффективность данного вещества наблюдалась при его совместном применении с катионными ПАВ. Следует отметить, что снижение МБК ДХЦК в отношении биопленок до значений планктонной формы наблюдалось только при использовании Трилон А.

Проведенные эксперименты показали, что бактерицидные концентрации ДВ не способны разрушить матрикс биопленок, но остался открытым вопрос, какое влияние эти вещества оказывают на формирующуюся и сформированную биопленку.

Экспрессия генов биопленкообразования *P. aeruginosa* при воздействии дезинфицирующих веществ

Изменение уровней экспрессии генов, участвующих в образовании биопленок, изучали на разных стадиях их формирования, таких как: начальное прикрепление (6 ч), образование микроколоний (12 ч), формирование (24 ч) и созревание биопленки (48 ч). Визуализацию процесса формирования биологической пленки *P. aeruginosa* проводили при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Исследования выявили характерную для биопленок трехмерную структуру организации. Толщина сформированной биопленки колебалась в пределах 10–40 мкм (рис.1).

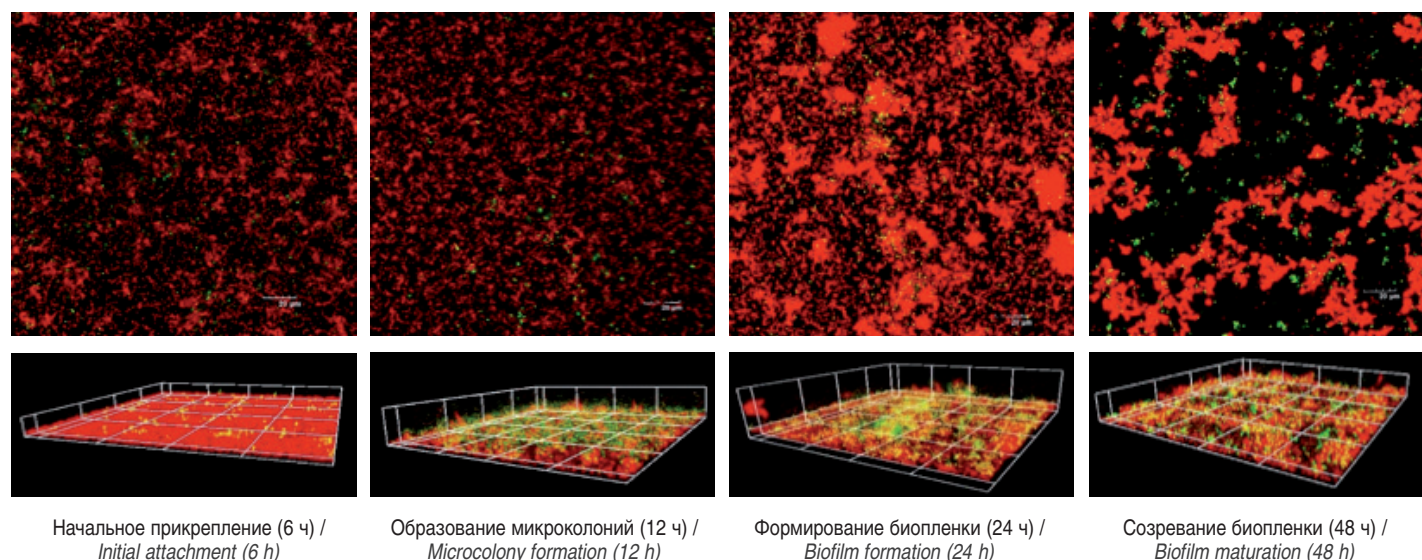


Рис. 1. Визуализация биологических пленок *P. aeruginosa* на различных стадиях формирования.
Fig. 1. Visualization of biological films of *P. aeruginosa* at various stages of formation.

Для исследования транскрипционного ответа клеток в составе биопленки на стресс применяли метод аппликаторов. В работе оценивалось изменение уровней экспрессии генов, ответственных за адгезию (*siaB*) [20], формирование матрикса (*algR*) [21] и устойчивость биопленок к антимикробным препаратам (*gyrB* и *oprL*) [22–23]. В качестве стрессового фактора использовали перекись водорода, ЧАС, гипохлорит натрия и ДХЦК в бактерицидных концентрациях.

При воздействии перекиси водорода в концентрации 2% на стадиях начального прикрепления и образования микроколоний не было зафиксировано значимых отличий в экспрессии генов, что, предположительно, связано с губительным действием биоцида на клетки, не защищенные матриксом (рис. 2А). На стадии формирования отмечалось небольшое (до 3 раз) увеличение уровня представленности гена *algR*, ответственного за формирование матрикса. На стадии созревания было зафиксировано резкое увеличение экспрессии всех изучаемых генов в ответ на стресс в 10–20 раз, что говорит о возможном увеличении количества экзополисахаридного матрикса и повышении устойчивости к антибактериальным веществам. Полученные результаты указывают на то, что *algR*, возможно, является регулятором формирования биопленки при воздействии окислительного стресса, что согласуется с исследованиями Rubio-Canalejas A. et al. [29].

Воздействие 0,05%-го раствора бензалкония хлорида на клетки в стадии формирования биопленки приводило к увеличению уровня экспрессии гена устойчивости к антимикробным препаратам (*oprL*), при этом на стадии зрелой биопленки экспрессия данного гена резко сокращалась, а экспрессия гена *algR*, ответственного за формирование матрикса, увеличивалась в 10 раз (рис. 2Б). Данный факт может свидетельствовать о различиях в механизмах резистентности формирующихся и сформированных биопленок. В исследовании Nematı S. et al. показано, что бензалкония хлорид в концентрации 0,07% индуцировал образование биопленки у клинических штаммов *P. aeruginosa* [30].

При использовании гипохлорита натрия в качестве стрессового фактора не было выявлено значимого изменения

уровня экспрессии изучаемых генов на стадиях развития и формирования биопленки (6–24 ч) (рис. 2В), что свидетельствует о достаточной эффективности применения бактерицидных концентраций данного вещества для предотвращения образования биопленок *P. aeruginosa*. Однако при воздействии на зрелую биопленку отмечалось резкое увеличение (до 20 раз) экспрессии гена *algR*. Схожую картину наблюдали при использовании ДХЦК. Ее применение в бактерицидной концентрации (0,0075% по активному хлору) приводит к увеличению уровня экспрессии гена, ответственного за выработку матрикса в биопленках (рис. 2Г), тем самым повышая устойчивость к обеззараживанию. Это обусловлено тем, что данный ген может играть роль в регулировании защиты от данных окислителей [31].

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что основным геном, ответственным за устойчивость сформированных биопленок к воздействию дезинфицирующих веществ, является *algR*.

Заключение

По результатам проведенных экспериментов подобраны минимальные действующие концентрации ДВ различных классов, обеспечивающие эффективное разрушение биопленок *P. aeruginosa*. Установлено, что наиболее эффективными являются хлорактивные и кислородоактивные ДВ. Выявлено, что применение ферментов класса гидролаз и ион-коагулянтов совместно с дезинфектантами обеспечивает снижение МБК от 2 до 10 раз. Отмечено, что воздействие ДВ на биопленки, находящиеся на ранних стадиях формирования, не приводит к увеличению их устойчивости. Показано, что обработка сформированной биопленки веществами в бактерицидных концентрациях приводит к увеличению уровней экспрессии генов, ответственных за адгезию, формирование матрикса и устойчивость к антимикробным препаратам, что свидетельствует о увеличении устойчивости биологических пленок *P. aeruginosa* к дезинфектантам.

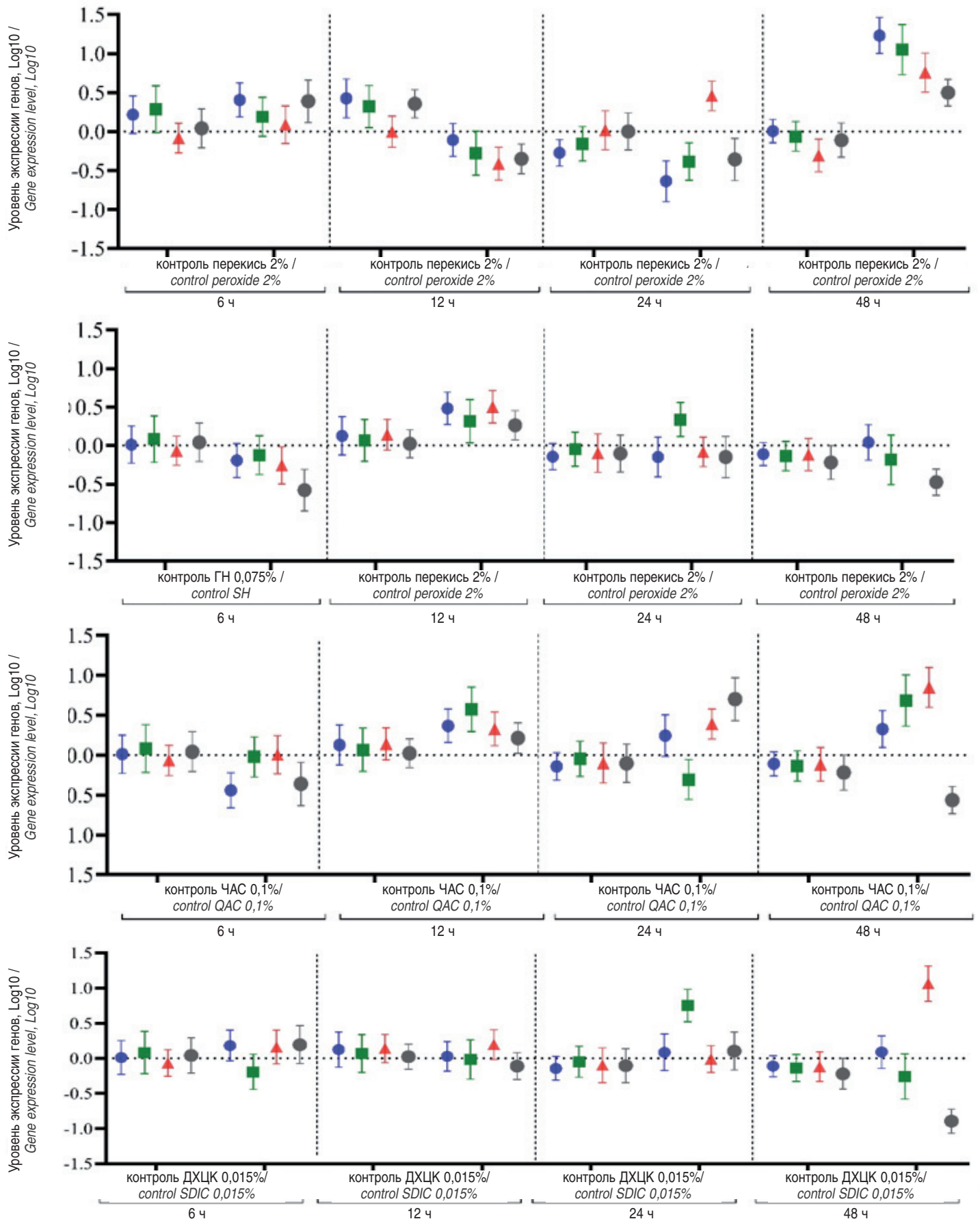


Рис. 2. Изменение уровней экспрессии генов биопленкообразования при воздействии: перекиси водорода (А), ЧАС (Б), гипохлорита натрия (В), ДХЦК (Г).
 Fig. 2. Changes in the expression levels of biofilm formation genes when exposed to: hydrogen peroxide (A), QAC (B), sodium hypochlorite (B), SDIC (Г).

● *siaB* ■ *gyrB*
 ▲ *algR* ● *oprL*

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the industry program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Fabre V, Amoah J, Cosgrove SE, Tamma PD. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: How long is long enough? Clin Infect Dis. 2019;69:2011-2014. DOI: 10.1093/cid/ciz223
- Lin T-I, Huang Y-F, Liu P-Y, Chou C-A, Chen Y-S, Chen Y-Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infective endocarditis in patients who do not use intravenous drugs: Analysis of risk factors and treatment outcomes. J Microbiol Immunol Infect. 2016;49:516-522. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.08.019
- Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clin Infect Dis. 2010;51:S81-S87. DOI: 10.1086/653053
- Ding C, Yang Z, Wang J, Liu X, Cao Y, Pan Y, et al. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: A systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis. 2016;49:119-128. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.06.014
- Soleimani M, Tabatabaei SA, Masoumi A, Mirshahi R, Ghahvechian H, Tayebi F, et al. Infectious keratitis: Trends in microbiological and antibiotic sensitivity patterns. Eye. 2021;35:3110-3115. DOI: 10.1038/s41433-020-01378-w
- Enzor R, Bowers EM, Perzia B, Perera C, Palazzolo L, Mammen A, et al. Comparison of Clinical Features and Treatment Outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in Contact Lens and Non-Contact Lens Wearers. Am J Ophthalmol. 2021;227:1-11. DOI: 10.1016/j.ajo.2021.02.024
- Phan S, Feng CH, Huang R, Lee ZX, Moua Y, Phung OJ, et al. Relative Abundance and Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from Chronic Wound Infections Globally. Microorganisms. 2023 May 5;11(5):1210. DOI: 10.3390/microorganisms11051210
- Vetrivel A, Ramasamy M, Vetrivel P, Natchimuthu S, Arunachalam S, Kim G-S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Control. Biologics 2021;1:312-36. DOI: 10.3390/biologics1030019
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Int J Mol Sci. 2020 Nov 17;21(22):8671. DOI: 10.3390/ijms21228671
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019 Jan-Feb;37(1):177-192. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- Yin R, Cheng J, Wang J, Li P, Lin J. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. Front Microbiol. 2022 Aug 26;13:955286. DOI: 10.3389/fmicb.2022.955286
- Masák J, Čejková A, Schreiberová O, Režanka T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. FEMS Microbiol Ecol. 2014 Jul;89(1):1-14. DOI: 10.1111/1574-6941.12344
- Tan X, Cheng X, Hu M, Zhang Y, Jia A, Zhou J, et al. Transcriptional analysis and target genes discovery of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm developed *ex vivo* chronic wound model. AMB Express. 2021 Nov 27;11(1):157. DOI: 10.1186/s13568-021-01317-2
- Руководство Р 4.2.3676-20. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. 2020. / Rukovodstvo R 4.2.3676-20. Metody laboratornykh issledovaniy i ispytaniy dezinfektsionnykh sredstv dlya otsenki ikh effektivnosti i bezopasnosti. 2020. (In Russian).
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998 May;28(3):449-61. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- Diivenji EV, Nevolina ED, Mart'yanov SV, Zhurina MA, Kalmantaeva OV, Makarova MA, et al. Binary Biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01: Dualistic Role of Kytococci and Cell Adhesion Alterations in the Presence of the A-Type Natriuretic Peptide. Microbiology. 2022 Sept; 91(5):563-576. DOI: 10.1134/S002626172260118X
- Детушева ЕВ, Родин ВБ, Слукин ПВ, Ершова ОН, Александрова ИА, Курдюмова НВ, и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015;17(1):57-66. / Detusheva EV, Rodin VB, Slukin PV, Ershova ON, Aleksandrova IA, Kurdyumova NV, et al. Susceptibility of nosocomial *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *P. mirabilis* strains to a chlorhexidine-based antiseptic preparation. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2015;17(1):57-66. (In Russian).
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45
- Amutha K, Kokila V. PCR Amplification, Sequencing of 16S rRNA Genes with Universal Primers and Phylogenetic Analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. 2014 Aug;3(8):257-261.
- Chen G, Gan J, Yang C, Zuo Y, Peng J, Li M, et al. The SiaA/B/C/D signaling network regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. EMBO J. 2020 Mar 16;39(6):e103412. DOI: 10.15252/embj.2019103412
- De Smet J, Wagemans J, Boon M, Ceysens PJ, Voet M, Noben JP, et al. The bacteriophage LUZ24 "Igy" peptide inhibits the *Pseudomonas* DNA gyrase. Cell Rep. 2021 Aug 24;36(8):109567. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109567
- Kong W, Zhao J, Kang H, Zhu M, Zhou T, Deng X, et al. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Res. 2015 Sep 30;43(17):8268-82. DOI: 10.1093/nar/gkv747
- Algammal AM, Eidaroos NH, Alfifi KJ, Alatawy M, Al-Harbi AI, Alanazi YF, et al. oprL Gene Sequencing, Resistance Patterns, Virulence Genes, Quorum Sensing and Antibiotic Resistance Genes of XDR *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Broiler Chickens. Infect Drug Resist. 2023 Feb 13;16:853-867. DOI: 10.2147/IDR.S401473
- Детушева ЕВ, Ершова ОН, Фурсова НК. Чувствительность планктонных культур и биопленок грамотрицательных бактерий к коммерческим препаратам дезинфектантов и антисептиков. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(7):438-447. / Detusheva EV, Ershova ON, Fursova NK. The sensitivity of planktonic cultures and biofilms of gram-negative bacteria to commercial disinfectant and antiseptic preparations. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2021;66(7):438-447. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-7-438-447 (In Russian).
- Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J Med Microbiol. 2008 Aug;57(Pt 8):966-973. DOI: 10.1099/jmm.0.47668-0.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010 Sep;8(9):623-33. DOI: 10.1038/nrmicro2415
- Abaturov A. Polysaccharide-degrading enzymes as agents dispersing bacterial biofilms. Child's Health. 2021;15(4):271-278.
- Bakht M, Alizadeh SA, Rahimi S, Kazemzadeh Anari R, Rostamani M, Javadi A, et al. Phenotype and genetic determination of resistance to common disinfectants among biofilm-producing and non-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains

- from clinical specimens in Iran. BMC Microbiol. 2022 May 7;22(1):124. DOI: 10.1186/s12866-022-02524-y
29. Rubio-Canalejas A, Admella J, Pedraz L, Torrents E. *Pseudomonas aeruginosa* Nonphosphorylated AlgR Induces Ribonucleotide Reductase Expression under Oxidative Stress Infectious Conditions. mSystems. 2023 Apr 27;8(2):e0100522. DOI: 10.1128/msystems.01005-22
30. Hemati S, Kouhsari E, Sadeghifard N, Maleki A, Omidi N, Mahdavi Z, et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of biocides induced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. New Microbes New Infect. 2020 Oct 19;38:100794. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100794
31. Lizewski SE, Lundberg DS, Schurr MJ. The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Infect Immun. 2002 Nov;70(11):6083-93. DOI: 10.1128/IAI.70.11.6083-6093.2002

Информация о соавторах:

Колупаева Надежда Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

ЩербакOVA Ольга Анатольевна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Колупаева Любовь Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Грищенко Наталья Семёновна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рудницкая Татьяна Ивановна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Nadezhda V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga A. Shcherbakova, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Lyubov V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalya S. Grishchenko, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

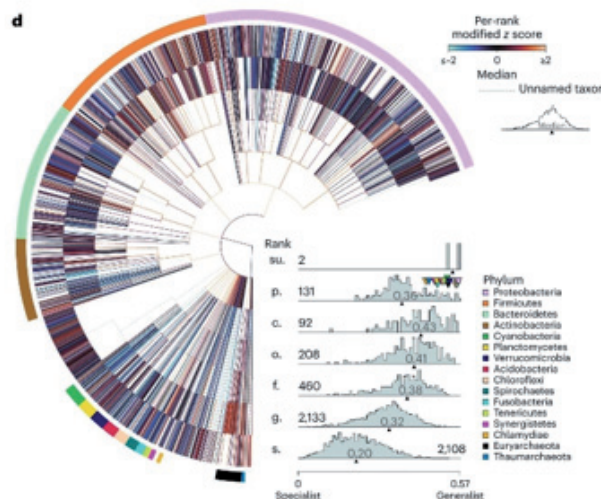
Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DScs, Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Оценка широты социальной ниши показывает стратегии диапазона ниш универсалов и специалистов

Универсалы могут выжить во многих средах, тогда как специалисты ограничены одной средой. Несмотря на то, что это классическая концепция в экологии, широта ниши остается сложной для количественной оценки микроорганизмов, поскольку она зависит от объективного определения окружающей среды. Определяя среду микроорганизма как сообщество, в котором он обитает, исследователи объединили информацию из более чем 22 000 образцов секвенирования окружающей среды, чтобы получить количественную меру ниши, которую мы называем шириной социальной ниши. На уровне родов они исследовали стратегии распределения ниш по всему прокариотическому древу жизни. Было обнаружено, что к социальным универсалам относятся оппортунисты, которые стохастически доминируют в местных сообществах, тогда как социальные специалисты стабильны, но малочисленны. У социальных универсалов более разнообразный и открытый пангеном, чем у социальных специалистов, но глобальной корреляции между шириной социальной ниши и размером генома не обнаружено. Вместо этого наблюдались две различные эволюционные стратегии, согласно которым специалисты имеют относительно небольшие геномы в местах обитания с низким местным разнообразием, но относительно большие геномы в местах обитания с высоким местным разнообразием. Этот анализ проливает свет на стратегии микробной ниши, основанный на данных.



Von Meijenfeldt FAB, Hogeweg P, Dutilh BE.

A social niche breadth score reveals niche range strategies of generalists and specialists. Nat Ecol Evol. 2023.

DOI: 10.1038/s41559-023-02027-7