

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП Д 03680, Украина

## ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* УКРАИНСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Исследовано биопленкообразование в стационарной системе на стекле трех коллекционных штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из организма человека. Показано, что исследуемые микроорганизмы характеризуются трехэтапным формированием биопленки: начальным образованием, дальнейшей частичной деградацией и повторным накоплением. Интенсивность биопленкообразования коррелирует с выживаемостью микроорганизмов в ее составе, что можно адекватно оценить с помощью метода «смыва». Образованию биопленки *P. aeruginosa* присущи штаммовые отличия, определяющие дальнейшие закономерности ее развития.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, биопленкообразование, стационарная система.

Микроорганизмы вида *Pseudomonas aeruginosa* рассматриваются как одни из основных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний [8]. Инфекции, вызванные данными возбудителями, характеризуются длительным течением и сложностью терапии, что связано с природной и/или приобретенной устойчивостью *P. aeruginosa* к используемым антибиотикам [11]. Способность к образованию биопленки существенно увеличивает их устойчивость к действию различных антимикробных средств [4]. Тем не менее, *P. aeruginosa* рассматриваются не только как клинически важные микроорганизмы, но и как один из модельных объектов для изучения биопленкообразования [13]. Исследование закономерностей формирования биопленки *P. aeruginosa* не только расширит общее понимание этого явления, но и позволит создать адекватную стратегию для предупреждения ее образования [5].

Поэтому целью нашей работы было изучение формирования биопленки коллекционными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*.

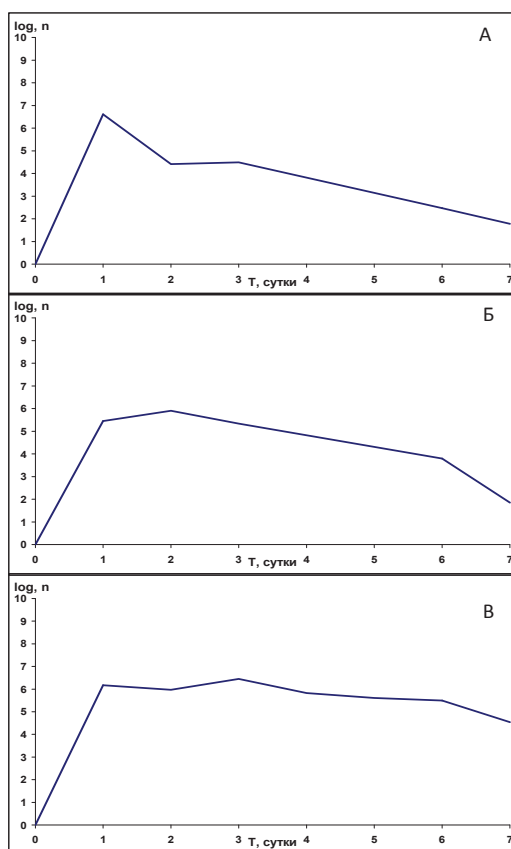
**Материалы и методы.** Исследование формирования биопленки проводили на выделенных из организма человека трех коллекционных штаммах *Pseudomonas aeruginosa*: УКМ В-1 (ATCC 10145), УКМ В-12 (ССМ 1500) и УКМ В-900 (ATCC 9027), любезно предоставленных д-р биол. наук, в.н.с. Киприановой Е.А. из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ, Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины). Динамику образования биопленки *P. aeruginosa* изучали в модификации по собственной методике в стационарной системе на стекле [1]. Для этого в бюксы 30×50 мм и объемом 20 мл вносили покровные стёкла 18×18 мм и 2 мл суспензии микроорганизмов, содержащей 2×10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Культивирование осуществляли при 37 °С на протяжении 7 суток, при этом, каждые 24 часа из бюксов отбирали покровные стёкла. Последние промывали 2-3 раза в 0,9 % растворе NaCl, фиксировали 10 мин в 96 % растворе этанола и окрашивали генциан-виолетом в течение 10 мин. Размеры образованной биопленки определяли с помощью светловой микроскопии с использованием микроскопа Micromed ХС-2610 при общем увеличении ×600 и дальнейшей ультрамикротографии препаратов цифровой фотокамерой Nikon CoolPix 5100. Полученные растровые изображения обрабатывали с использованием программы TotalLab TL120, показатель биопленкообразования рассчитывали по площади поверхности соответствующих образований.

При определении сформированной биопленки указанным методом не учитывается один из наиболее значимых ее компонентов – количество жизнеспособных микроорганизмов. Поэтому, для более детального изучения биопленкообразования одновременно с методом количественного подсчета структур было также использо-

© А.Б. Балко, О.И. Балко, Л.В. Авдеева, 2013

вано метод «смыва» – определение в составе бактериальной биоплёнки количества жизнеспособных клеток. Для этого отмытые от планктонной формы бактерий образцы помещали в бюксы с 5 мл 0,9 % раствора NaCl и в течение 45 мин поддавали интенсивному механическому отделению клеток биопленки от поверхности стекла на магнитной мешалке. В полученной суспензии из смытой в раствор биопленочной формы бактерий определяли титр [2], который указывал на количество жизнеспособных клеток псевдомонад в составе биопленки.

**Результаты.** Исследование жизнеспособности клеток *P. aeruginosa* УКМ В-900 в составе биопленки показало, что максимальное их накопление обнаруживается на 1 сутки культивирования и составляет  $4,1 \times 10^6$  КОЕ/мл (рис. 1, А). В течение последующего периода наблюдения количество клеток в смывах характеризовалось убывающей логарифмической зависимостью и на 7 сутки их титр составлял  $6 \times 10^1$  КОЕ/мл. Для *P. aeruginosa* УКМ В-1 количество жизнеспособных клеток в составе биопленки достигало максимальных значений на вторые сутки культивирования (рис. 1, Б). При этом титр микроорганизмов в смытой суспензии был несколько ниже такого у штамма УКМ В-900 и составлял  $8,2 \times 10^5$  КОЕ/мл. После достижения максимальных значений количество жизнеспособных клеток *P. aeruginosa* УКМ В-1 равномерно уменьшалось и на конечном этапе наблюдения в смыве обнаруживалось  $7 \times 10^1$  КОЕ/мл микроорганизмов. Следует отметить, что, несмотря на более медленное нарастание количества жизнеспособных клеток *P. aeruginosa* УКМ В-1 в биопленочной форме, особенности выживания микроорганизмов исследованных штаммов в составе биопленки характеризовались существенным сходством.



**Рис. 1. Количество жизнеспособных клеток в составе биоплёнки исследованных штаммов: А – *P. aeruginosa* УКМ В-900; Б – *P. aeruginosa* УКМ В-1; В – *P. aeruginosa* УКМ В-12. Здесь и дальше: n – количество смытых клеток; Т – длительность наблюдения.**

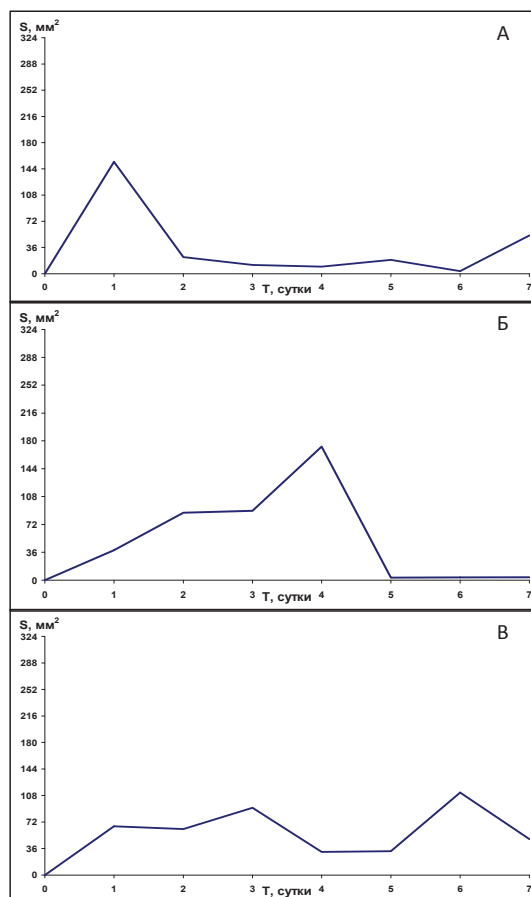
Анализ жизнеспособности клеток *P. aeruginosa* УКМ В-12 в формируемой ими биопленке выявил некоторые особенности, не характерные описанным ранее штаммам. Максимальное увеличение количества бактерий УКМ В-12 – до  $5,5 \times 10^6$  КОЕ/мл наблюдали в смывах на первые сутки культивирования (рис. 1, В). Однако в течение дальнейших двух суток титр клеток практически не изменялся. Некоторое снижение количества микроорганизмов было отмечено только на 4 сутки культивирования, тогда как на 7 сутки в составе биопленки все еще обнаруживалось достаточно высокое количество бактерий –  $3,5 \times 10^4$  КОЕ/мл. Следует отметить, что на конечном этапе наблюдения количество жизнеспособных клеток в биопленочной форме этого штамма составляло более половины от исходных показателей, а у *P. aeruginosa* УКМ В-1 и УКМ В-900 уменьшалось практически до минимально выявляемых значений. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в составе биопленки клетки *P. aeruginosa* УКМ В-12 характеризуются высшей, а у штаммов УКМ В-1 и УКМ В-900 соответственно низшей способностью к выживанию.

В дальнейшем у исследуемых микроорганизмов определяли количественные показатели биопленкообразования. Так, для *P. aeruginosa* УКМ В-900 образование максимального количества биопленки, которая покрывала почти 50 % поверхности стекла, наблюдалось на первые сутки культивирования (рис. 2, А). Тем не менее, уже на следующие сутки ее площадь резко сокращалась до 22,9 мм<sup>2</sup>, после чего указанный уровень поддерживался на протяжении дальнейшего периода наблюдения. Незначительное увеличение количества биопленки до 52,6 мм<sup>2</sup> наблюдали лишь на 7 сутки культивирования. Биопленкообразование у *P. aeruginosa* УКМ В-1, по сравнению с таким у вышеупомянутого штамма, характеризовалось некоторыми особенностями (рис. 2, Б). В этом случае площадь биопленки равномерно увеличивалась и достигала максимума – 172 мм<sup>2</sup> на 4 сутки наблюдения. В дальнейшем, как и у штамма УКМ В-900, было отмечено значительное сокращение ее количества практически до нулевых значений, которое поддерживалось на этом уровне в течение последующих 48 часов. Повторное увеличение площади биопленки до 171,5 мм<sup>2</sup> у *P. aeruginosa* УКМ В-1 было отмечено на 8 сутки культивирования (данные на графике не показаны). Эта особенность, а также общая динамика формирования биопленки с начальным накоплением и дальнейшей резкой деградацией указывают на сходство процесса биопленкообразования у штаммов УКМ В-900 и УКМ В-1.

Наблюдение за *P. aeruginosa* УКМ В-12 показало, что формирование биопленки этим штаммом носит довольно неравномерный характер (рис. 2, В). Так, на первые сутки культивирования площадь биопленки составляла 66,3 мм<sup>2</sup>, в дальнейшем незначительно уменьшалась, а на третьи сутки – повторно увеличивалась уже до 91,4 мм<sup>2</sup>. Этот период, очевидно, следует рассматривать как первый этап накопления биопленки. В последующие двое суток у *P. aeruginosa* УКМ В-12 наблюдалось уменьшение количества биопленки в среднем до 32 мм<sup>2</sup>. Можно отметить, что период частичной деградации у штамма УКМ В-12 был относительно коротким и менее выраженным, по сравнению с такими у описанных выше микроорганизмов. На конечном этапе наблюдения у *P. aeruginosa* УКМ В-12 отмечали повторное увеличение количества биопленки до 112,1 мм<sup>2</sup>. Таким образом, биопленкообразованию исследованных штаммов *P. aeruginosa* характерны некоторые общие закономерности: исходное образование, переходящее в частичную деградацию, за которой следует повторное ее накопление. При этом, описанная динамика прослеживается у изученных штаммов несмотря на их довольно выраженные штаммовые отличия.

Следует отметить, что на протяжении всего периода наблюдения клетки *P. aeruginosa* УКМ В-12 формировали биопленку, которая покрывала не больше 30 % поверхности стекла. Однако, резких колебаний с уменьшением ее площади практически до нулевых значений, характерных штаммам УКМ В-900 и УКМ В-1,

также не отмечалось. Поэтому, общее количество образованной за весь период наблюдения биопленки у *P. aeruginosa* УКМ В-12 было наибольшим, несколько низшие показатели выявлялись у штамма УКМ В-1, а *P. aeruginosa* УКМ В-900 характеризовались минимальным ее накоплением. Можно отметить, что при интенсивном биопленкообразовании показатели выживаемости микроорганизмов также выявлялись на высоком уровне, а при менее выраженном – были, соответственно, низкими, что указывает на корреляционную связь между этими процессами.



**Рис. 2. Формирование биоплёнки исследованными штаммами:**  
**А – *P. aeruginosa* УКМ В-900; Б – *P. aeruginosa* УКМ В-1; В – *P. aeruginosa* УКМ В-12. S – площадь образованной биоплёнки.**

**Обсуждение.** Наблюдаемые нами закономерности согласуются с данными, описанными в работах других исследователей. Так, согласно Morató J., Codony F., Mas J. [9], микроорганизмы в природной среде способны образовывать на стеклянных образцах биопленку, которая также характеризуется двумя максимумами накопления и промежуточным периодом уменьшения ее количества. Аналогичная динамика формирования биопленки *P. aeruginosa* была описана в работе Barraud N., Hassett D.J., Hwang S.-H. et al. [3]. В то же время Stewart P.S. [12], исследующий на модели *P. aeruginosa* значение биопленки в устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, указывал на постепенное нарастание количества бактерий в ее составе, которое несколько уменьшалось только на 10 сутки наблюдения. В другом случае, Purevdorj-Gage B., Costerton W. J., Stoodley P. [13], для двух диких и одного мутантного штаммов *P. aeruginosa* выявляли образование ими биопленки, покрывающей

100 % поверхности образца начиная со вторых суток и вплоть до конца исследования. Возможно, выявленные отличия связаны с использованием в указанных работах системы проточного культивирования, когда состав среды регулярно обновляется, а микроорганизмы в составе биопленки не испытывают голодания и угнетения роста продуктами собственного метаболизма. В использованной нами стационарной системе указанные факторы, очевидно, существенным образом влияют на формирование биопленки. Это, возможно, является причиной выявленных отличий, но, тем не менее, приближает условия эксперимента к естественным.

Рассматривая описанное нами трехэтапное образование биопленки, особый интерес представляет последний этап ее накопления. Среди возможных причин подобного явления можно отметить наличие в бактериальной популяции клеток-персистеров, способных активироваться при гибели большинства микроорганизмов в составе биопленки [7]. В нашем случае активация персистеров, очевидно, является маловероятной, поскольку на этапе вторичного накопления биопленки повышение количества жизнеспособных клеток в смывах не обнаруживали. Иными причинами вторичного накопления биопленки могут быть активация матриксproduцирующих клеток [7], переход микроорганизмов из планктонной в биопленочную форму существования [10] либо одновременное массовое осаждение на стекле нежизнеспособных клеток. Остается также невыясненной причина увеличения площади биопленки у *P. aeruginosa* УКМ В-1 на 4 сутки культивирования, когда количество жизнеспособных микроорганизмов в ее составе, начиная с 3 суток, уменьшается. Таким образом, описанная особенность биопленкообразования исследованных штаммов требует более тщательного изучения.

В проведенных нами исследованиях было показано существенные штаммовые отличия биопленкообразования у микроорганизмов одного вида. Похожие результаты относительно неоднородности формирования биопленки разными штаммами *P. aeruginosa* выявляли также Wang E.W., Jung J.Y., Pashia M.E. et al. [14]. К подобным выводам приходят Lee B., Naagensen J.A.J., Ciofu O. et al. [6], изучавшие особенности биопленкообразования у клинических изолятов *P. aeruginosa*. Анализируя возможные причины выявленных нами штаммовых отличий при образовании биопленки *P. aeruginosa* и, соответственно, выживаемости микроорганизмов в ее составе, было обращено внимание на место их первичного выделения. Соответственно данным Американской и Чешской коллекций типовых культур, микроорганизмы *P. aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027) были выделены из внешнего уха человека, УКМ В-1 (ATCC 10145) – из культуры крови, а бактерии УКМ В-12 (ССМ 1500) – из дыхательных путей человека. Можно предположить, что интенсивная циркуляция воздуха, небольшое количество секрета и обилие лимфоидной ткани в дыхательных путях [15] вызывает необходимость поддерживать биопленку на невысоком уровне в течение длительного времени. Высокоагрессивная для бактерий среда крови [15], очевидно, требует образования значительно большего количества биопленки, необходимой для защиты микроорганизмов и дальнейшей диссеминации по кровотоку. Отсутствие существенного влияния иммунной системы макроорганизма и относительная защищенность от воздействия физических факторов внешней среды, позволяют рассматривать кожные покровы внешнего уха человека как наиболее «безопасные» из указанных биотопов для микроорганизмов. Данные условия, очевидно, не требуют от бактерий образования высокоустойчивой биопленки. Можно отметить, что предложенные теоретические особенности биопленкообразования находят отражение в динамике ее накопления исследуемыми штаммами *P. aeruginosa* в экспериментальных условиях. Исходя из этого сделано предположение, что в процессе

первичной адаптации к условиям существования бактерии вырабатывают особые закономерности формирования биопленки, которые, очевидно, определенным образом сохраняются и, в дальнейшем, проявляются даже при смене среды обитания.

Таким образом, биопленкообразование *P. aeruginosa* УКМ В-900, УКМ В-1 и УКМ В-12 в стационарной системе на стекле характеризуется трехэтапностью, которая заключается в исходном формировании биопленки, ее частичной деградацией и дальнейшем повторном накоплении. Образованию биопленки определенным образом соответствует выживаемость микроорганизмов в ее составе, которую можно адекватно оценить с помощью метода «смыва». Биопленкообразованию *P. aeruginosa* присущи штаммовые отличия, которые, возможно, зависят от места их первичного выделения и определяют дальнейшие закономерности формирования биопленки.

*О.Б. Балко, О.І. Балко, Л.В. Авдеева*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ*

### **ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* УКРАЇНСЬКОЇ КОЛЕКЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ**

#### **Резюме**

Досліджено біоплівкоутворення у стаціонарній системі на склі трьох колекційних штамів *P. aeruginosa*, виділених з організму людини. Показано, що досліджувані мікроорганізми характеризуються трьохетапним формуванням біоплівки: початковим утворенням, подальшою частковою деградацією і повторним накопиченням. Інтенсивність біоплівкоутворення корелює із виживанням мікроорганізмів у її складі, що можна адекватно оцінити за допомогою методу «змиву». Утворенню біоплівки *P. aeruginosa* характерні штамові відмінності, які визначають подальші закономірності її розвитку.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa*, біоплівкоутворення, стаціонарна система.

*A.B. Balko, O.I. Balko, L.V. Avdeeva*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

### **BIOFILM FORMATION BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS OF UKRAINIAN COLLECTION OF MICROORGANISMS**

#### **Summary**

The biofilm formation of three *P. aeruginosa* collection strains, isolated from human body, was investigated in stationary system on glass. It was shown, that biofilm formation of these microorganisms has three stages: initial formation, the further partial degradation and repeated accumulation. The intensity of biofilm formation correlates with survival rate of microorganisms in its structure that may be estimated by means of the «washout» method. The strain differences are typical of *P. aeruginosa* biofilm formation and determine further regularities of its development.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm formation, stationary system.

**The author's address:** Balko A.B., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP D03680, Ukraine.

1. Балко О.Б., Авдеева Л.В. Вплив температурного фактора на особливості формування біоплівки бактеріями виду *Pseudomonas aeruginosa* // Медицина сьогодні і завтра. – 2009. – № 3-4. – С. 23–27.
2. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Широбоков В.П. Практична мікробіологія. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.



3. Barraud N., Hassett D.J., Hwang S.-H., Rice S.A., Kjelleberg S., Webb J.S. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. – 2006. – **188**, N 21. – P. 7344–7353.
4. Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – **35**, N 4. – P. 322–332.
5. de Kievit T. R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Environ. Microbiol. – 2009. – **11**, N 2. – P. 279–288.
6. Lee B., Haagensen J.A.J., Ciofu O., Andersen J.B., Høiby N., Molin S. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis // J. Clin. Microbiol. – 2005. – **43**, N 10. – P. 5247–5255.
7. López D., Vlamakis H., Kolter R. Biofilms // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – **2**, N 7. – P. a000398.
8. Lyczak J.B., Cannon C., Pier G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist // Microb. Infect. – 2000. – **2**, N 9. – P. 1051–1060.
9. Morató J., Codony F., Mas J. Microscopy techniques applied for monitoring the development of aquatic biofilms // Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education. – Badajoz, Spain: FORMATEX, 2004. – P. 93–100.
10. Purevdorj-Gage B., Costerton W.J., Stoodley P. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Microbiology. – 2005. – **151**, N 5. – P. 1569–1576.
11. Rossolini G.M., Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* // Clin. Microbiol. Infect. – 2005. – **11**, N 4. – P. 17–31.
12. Stewart P.S. Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrob. Agents Chemother. – 1994. – **38**, N 5. – P. 1052–1058.
13. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities // Annu. Rev. Microbiol. – 2002. – **56**. – P. 187–209.
14. Wang E.W., Jung J.Y., Pashia M.E., Nason R., Scholnick S., Chole R.A. Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains as competent biofilm formers // Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. – 2005. – **131**, N 11. – P. 983–989.
15. Wheelis M.L. Principles of modern microbiology. – Sudbury, Mass: Jones and Bartlett Publishers, 2008. – 496 p.

Отримано 17.10.2012