

УДК 615.32

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-2-3-27-30

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ХИТОЗАНА НА БИОПЛЕНКИ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS И *PSEUDOMONAS INDICA***

© О.В. Рыбальченко, О.Г. Орлова, И.В. Ларионов, И.Л. Потокин, Г.В. Черкасова

При развитии инфекционных заболеваний, вызванных условно патогенными бактериями, формируются особые формы микробных сообществ – бактериальные биопленки, способные экранировать поверхность слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта. В биопленках, благодаря особым защитным структурам, микробные клетки могут синтезировать биологически активные вещества и проявлять повышенную устойчивость к действию гуморальных факторов защиты макроорганизма и антимикробных препаратов. В связи с поиском новых лечебно-профилактических препаратов, обладающих способностью эффективно подавлять развитие бактериальных биопленок условно патогенных бактерий, но, при этом, не повреждать структуру нормального микробиоценоза проведено электронно-микроскопическое исследование и выявлены ингибирующие свойства хитозана на биопленки условно патогенных бактерий *S. aureus* и *P. indica*.

Ключевые слова: бактериальные биопленки, хитозан, условно патогенные бактерии, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas indica*, электронная микроскопия.

Введение. В настоящее время наблюдается увеличение частоты и тяжести острых инфекционных заболеваний, вызванных условно патогенными бактериями (УПБ), при этом на фоне дисбиотического состояния часто возникают дисфункции в работе желудочно-кишечного тракта [1, 2]. По данным ряда исследователей многие УПБ формируют особые формы микробных сообществ – бактериальные биопленки, способные экранировать поверхность слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта [3, 4]. Основная масса таких микроорганизмов распределена по поверхности пристеночного слоя слизи, представленного муцином, который по своей химической природе близок полисахаридной капсуле большинства бактерий [5]. При достижении в бактериальных биопленках плотности популяции не менее 10^6 клетки начинают синтезировать целый ряд биологически

активных веществ, контролируемых системой глобальной регуляции Quorum Sensing (Чувства Кворума). Считается, что бактерии, находящиеся в составе биопленок, способны к метастазированию путем транслокации из кишечника в лимфу и системный кровоток [6]. Экранированные специализированными защитными структурами в биопленках условно патогенные бактерии характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию гуморальных факторов защиты макроорганизма и антимикробных препаратов. В связи с этим, все более актуальной становится проблема разработки новых лечебно-профилактических препаратов, обладающих способностью эффективно подавлять развитие бактериальных биопленок УПБ, но, при этом, не повреждающих структуру нормального микробиоценоза [7, 8]. Одним из наиболее перспективных направлений в создании лечебных

РЫБАЛЬЧЕНКО Оксана Владимировна – д.б.н., Санкт-Петербургский государственный университет, ФГУП Гос НИИ «Особо чистых биопрепаратов», e-mail: OVR@inbox.ru

ОРЛОВА Ольга Геннадьевна – к.б.н., Санкт-Петербургский государственный университет, ФГУП Гос НИИ «Особо чистых биопрепаратов», e-mail: OVR@inbox.ru

ЛАРИОНОВ Иван Владимирович, ФГУП Гос НИИ «Особо чистых биопрепаратов», e-mail: OVR@inbox.ru

ПОТОКИН Игорь Леонидович, ФГУП Гос НИИ «Особо чистых биопрепаратов», e-mail: OVR@inbox.ru

ЧЕРКАСОВА Галина Владимировна, ФГУП Гос НИИ «Особо чистых биопрепаратов», e-mail: OVR@inbox.ru

препаратов, селективно ингибирующих рост патогенных и условно патогенных микроорганизмов, может быть использование препаратов на основе хитозана, который по данным некоторых авторов, способен подавлять жизнеспособность УПБ, но и при этом оказывать стимулирующий эффект на развитие пробиотических бактерий [9, 10]. Следует отметить, что в настоящее время данные об эффекте воздействия хитозана на микробные сообщества УПМ в виде бактериальных биопленок отсутствуют.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния хитозана на биопленки условно патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* 6 и *Pseudomonas indica* 3 микробиологическими и электронно-микроскопическими методами.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись музейные культуры *S. aureus* 6 и *P. indica* 3. Бактерии получены из музея культур НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва. В работе использовали высокомолекулярный хитозан ООО «Биопрогресс» с молекулярной массой 320-350 кДа. Влияние хитозана изучали, выявляя его воздействие на развивающиеся и полностью сформированные 1-суточные бактериальные биопленки *S. aureus* 6 и *P. indica* 3 на плотных питательных средах в условиях опыта *in vitro*. Для исследования использовали готовый образец хитозана, который в количестве 0,1 г помещали на свежесаянный бактериальный газон или 0,5 г вводили в 10 мл расплавленного и остуженного до 45°C агара. Полученную суспензию помещали на поверхность сформированного бактериального газона. Пробы инкубировали 24 часа при температуре 37°C. Электронно-микроскопические методы. Для получения препаратов бактериальные биопленки *S. aureus* 6 и *P. indica* 3 при визуальном выражении воздействия хитозана отбирали с пограничных участков бактериального роста на плотной питательной среде вместе с фрагментами агаровых пластинок. Пробы готовили по описанному ранее авторами способу и просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100C (JEOL, Япония) [11].

Результаты. Воздействие хитозана на формирующиеся биопленки бактерий *S. aureus* 6 и *P. indica* 3 проявлялось в виде образования зон подавления роста на поверхности агара, величина которых составляла 10-12 мм. При ис-

следовании электронно-микроскопическими методами биопленок *S. aureus* 6 с пограничных участков зон подавления роста при воздействии хитозана отмечали ультраструктурные изменения как в биопленках, так и в самих клетках бактерий (рис. 1).



Рис. 1. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Ультратонкий срез биопленки *S. aureus* 6 после воздействия хитозана. Отсутствие целостной поверхностной пленки (ОП), деструкция клеточных стенок (ДКС) и лизис единичных клеток. Ув. x 20000.

На исследуемых участках биопленок *S. aureus* 6 отсутствовали защитные структуры в виде поверхностных пленок, характерные для интактного состояния микробных сообществ стафилококков (рис. 2). Нарушение целостности клеток *S. aureus* 6 проявлялось, в первую очередь, в деструкции их клеточных стенок, которая сопровождалась их частичным отслоением от цитоплазматической мембраны, что приводило к лизису единичных клеток.

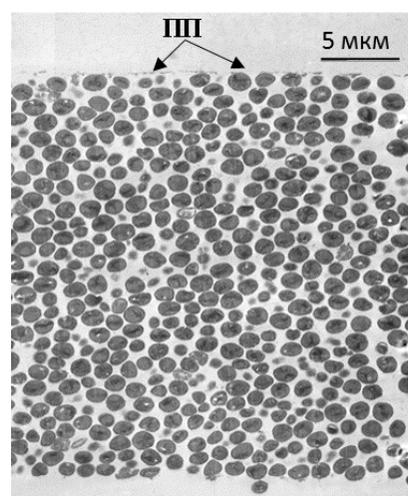


Рис. 2. ТЭМ. Ультратонкий срез 1-суточной интактной биопленки *S. aureus* 6. Поверхностная пленка (ПП) на верхней части биопленки, отсутствие разрушающихся клеточных стенок и лизированных клеток. Ув. x 5000

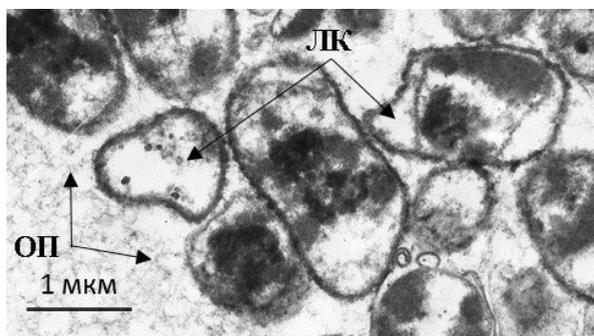


Рис. 3. ТЭМ. Ультратонкий срез 1-суточной биопленки *P. indica* 3 после воздействия хитозана. Отсутствие целостной поверхностной пленки (ОП), деструкция и лизис (ЛК) всех клеток. Ув. x 25000

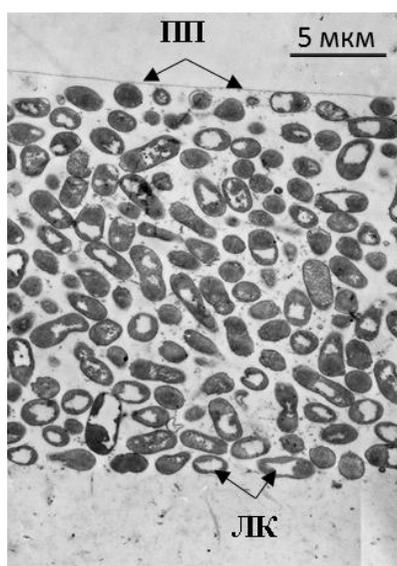


Рис. 4. ТЭМ. Ультратонкий срез 1-суточной интактной биопленки *P. indica* 3. Поверхностная пленка (ПП) на верхней части биопленки, частичный лизис клеток (ЛК). Ув. x 5000.

На ультратонких срезах биопленок *P. indica* 3, приготовленных из препаратов, полученных в аналогичных условиях воздействия хитозана, наблюдали значительные деструктивные изменения в биопленках, одним из основных являлось отсутствие на их поверхности защитных наслоений (рис. 3). Морфологические изменения в клетках *P. indica* 3 при воздействии хитозана проявлялись в виде расслоения клеточной стенки с последующим расширением периплазматического пространства по всей поверхности клетки, при этом отмечали перераспределение электронной плотности цитоплазмы в виде зон просветления, свидетельствующее о лизисе содержимого клеток. При этом в контрольных образцах биопленок *P. indica* 3 со-

хранялась интактная структура поверхностной пленки и входящих в ее состав бактериальных клеток (рис. 4).

Заключение. Выявленные на электронно-микроскопическом уровне изменения морфологических свойств биопленок и клеток условно патогенных бактерий, свидетельствовали о повреждающем действии хитозана на микробные сообщества бактерий *S. aureus* 6 и *P. indica* 3. Показано, что хитозан на участках биопленок, близких к границам подавления роста обеих культур УПБ, препятствовал образованию комплекса защитных структур в виде поверхностных пленок. Хитозан вызывал деструктивные изменения в клеточной стенке *P. indica* 3, приводя к полному лизису клеток в биопленке. Воздействие хитозана на клетки *S. aureus* 6 в биопленках вызывало лишь частичное разрушение их клеточных стенок. Основным проявлением воздействия хитозана на стафилококки можно считать отдельные случаи нарушения деления клеток, о чем свидетельствовало появление начальных признаков деструктивных изменений – неровной толщины клеточной стенки и асимметричности делящихся клеток.

Таким образом, дифференцированное воздействие хитозана на ультратонкую организацию биопленок условно патогенных бактерий проявлялось на клеточном и на популяционном уровне. Наблюдаемое разнообразие ультраструктурных изменений исследуемых культур отражает специфичность протекания деструктивных процессов в клетках каждого конкретного вида микроорганизмов УПБ, однако деструктивные нарушения в биопленках носят универсальный характер – контакт с хитозаном приводит к нарушению образования защитных структур на биопленках.

Литература

1. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека. М.; Тверь: Триада, 2007. 64 с.
2. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника, как клинко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы: рук. для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 304 с.
3. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития. Генетика. 2004. 40(11): 1-12.

4 Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Добрица В.П. Атлас ультраструктуры нормальной микрофлоры человека. СПб.: Изд-во ВМА, 2008. 112 с.

5. Чернин В.В., Парфенов А.И., Бондаренко В.М. и др. Симбионтное пищеварение человека. Изд-во «Триада», 2013. 232 с.

6. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека. Эксперим. клин. гастроэнтерол. 2007. № 5. С. 86-93.

7. Бондаренко В.М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях. Consilium Medicum, 2005. № 7. С. 437-443.

8. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В. Анализ профилактического и лечебного действия пробиотических препаратов с позиций новых научных технологий. Журн. Микробиол. 2015. № 2. С. 90-104.

9. Хитозан: сб. ст. / ред. К.Г. Скрыбин и др. М.: Центр "Биоинженерия", 2013. 591 с.

10. Rhoades J., Roller S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66 (1): 80-86.

11. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г., Гуслева О.Р., Ларионов И.В., Фиалкина С.В. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл // Микробиология. 2010. № 6. С. 66–70.



IMPACT OF CHITOSANE ON BIOFILMS OF PATHOGENIC BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *PSEUDOMONAS INDICA*

© O.V. Rybalchenko^{1,2}, O.G. Orlova^{1,2}, I.V. Larionov², I.L. Potokin², G.V. Cherkasova²

¹St. Petersburg State University;

²Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

Infectious diseases caused by conditionally pathogenic bacteria, special forms of microbial communities are forming bacterial biofilms that can screen the surface of the mucous membranes of the gastrointestinal tract. Biofilms, due to special protective structures, microbial cells can synthesize biologically active substances and show increased resistance to the effects of humoral factors of the protection of the macroorganism and antimicrobial agents. In connection with the search for new therapeutic and prophylactic drugs with the ability to effectively inhibit the development of bacterial biofilms of opportunistic pathogens, but without damaging the structure of normal microbiocenosis, an electron microscopic study was conducted and the inhibitory properties of chitosan on biofilms of opportunistic bacteria *S. aureus* 6 and *P. indica* 3.

Key words: bacterial biofilms, chitosan, conditionally pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas indica*, electron microscopy.