



Изучение формирования биопленок культурой *Pseudomonas aeruginosa* при различных режимах культивирования

Т. Е. Миронова¹, В. С. Черепушкина², В. Н. Афонюшкин³, Н. В. Давыдова⁴, В. Ю. Коптев⁵, А. С. Димова⁶

¹⁻⁵ ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН),

р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия

^{1,3,6} ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ), г. Новосибирск, Россия

³ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН),

г. Новосибирск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-0860-1778>, e-mail: mironovatanya9@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-5177-4733>, e-mail: vicky88@bk.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-3378-7335>, e-mail: lisocim@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-4831-2957>, e-mail: ramira_@bk.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-0537-6659>, e-mail: kastrolog@mail.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0307-4876>, e-mail: alesya-77@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Настоящее исследование посвящено изучению влияния условий культивирования на рост и формирование биопленок культурой *Pseudomonas aeruginosa*. В связи с высокой частотой встречаемости инфекционных заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*, а также устойчивостью синегнойной палочки, в особенности из-за способности образовывать биопленки, данная тема не теряет актуальности. В работе проанализировали влияние на феномен биопленкообразования таких характеристик, как используемая для посева фаза роста культуры (логарифмическая, стационарная), объем среды для выращивания (0,2 и 1,0 мл) и концентрация питательных веществ (жидкие питательные среды, разведенные до концентраций 50; 25; 12,5 и 6%) в объеме культивирования. Проведенные исследования показали, что на образование биопленок оказывает влияние совокупность всех перечисленных параметров. Установлено, что определяющим фактором в формировании биопленок являлась фаза роста бактерий, в которой функционировала культура синегнойной палочки перед инокуляцией. При посеве *P. aeruginosa*, пребывающей в стационарной фазе роста, образование биопленок нелинейно зависело от концентрации питательных веществ и общего их количества в объеме культивирования. Линейная зависимость образования биопленок от концентрации питательных веществ в среде культивирования была более выражена при посеве *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста. Установлено, что при меньших концентрациях компонентов питательных сред различия в образовании биопленок были более заметны и имели статистическую значимость. Разбавление жидкой питательной среды в 2 раза не влияло на интенсивность формирования пленки, в то время как 4–8-кратное снижение концентрации питательных веществ в объеме культивирования 0,2 мл ингибировало образование биопленок. В объеме среды для культивирования, равном 1,0 мл, формирование биопленок было равномерным, а в объеме 0,2 мл статистически значимо снижалось при разведении питательной среды в 4 и 8 раз. Объем культивирования также имеет важное значение: так, выращенные в 0,2 мл питательной среды культуры при разных концентрациях питательных веществ формировали меньшее количество биопленок, чем микроорганизмы, культивируемые в объеме 1,0 мл. При этом при посеве *P. aeruginosa*, находящихся как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста, более выраженным было образование биопленок в лунках с большим объемом культивирования.

Ключевые слова: биопленки, бактерии, *P. aeruginosa*, синегнойная палочка, фаза стационарного роста, фаза логарифмического роста

Благодарности: Результаты получены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер соглашения 075-15-2021-1085).

Для цитирования: Миронова Т. Е., Черепушкина В. С., Афонюшкин В. Н., Давыдова Н. В., Коптев В. Ю., Димова А. С. Изучение формирования биопленок культурой *Pseudomonas aeruginosa* при различных режимах культивирования. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 35–41. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-35-41.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Афонюшкин Василий Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий сектором молекулярной биологии ИЭВСИДВ СФНЦА РАН, 630501, Россия, Новосибирская область, Новосибирский район, р. п. Краснообск, а/я 8, e-mail: lisocim@mail.ru.

Studying formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown under different cultivation conditions

T. E. Mironova¹, V. S. Cherepushkina², V. N. Afonyushkin³, N. V. Davydova⁴, V. Yu. Koptev⁵, A. S. Dimova⁶

¹⁻⁵ Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences (SFSCA RAS), Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia

^{1,3,6} FSBEI HE “Novosibirsk State Agrarian University” (FSBEI HE Novosibirsk SAU), Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS), Novosibirsk, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0003-0860-1778>, e-mail: mirnovatanyaya9@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-5177-4733>, e-mail: vicky88@bk.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-3378-7335>, e-mail: lisocim@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-4831-2957>, e-mail: ramira_@bk.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-0537-6659>, e-mail: kastrolog@mail.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0307-4876>, e-mail: alesya-77@mail.ru

SUMMARY

The purpose of the present study is to assess how cultivation conditions influence growth and formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. The topic is of great importance due to high incidence of *P. aeruginosa*-caused infections and *P. aeruginosa* resistance associated with its ability to form biofilms. The paper analyzes factors that influence biofilm formation, i.e.: growth phase used for inoculation (log, stationary), volume of the growth medium (0.2 and 1.0 ml) and concentration of nutrients (liquid nutrient media diluted to concentrations of 50; 25; 12.5 and 6%) in the cultivation volume. As the research demonstrates, all these factors influence biofilm formation; and a *P. aeruginosa* growth phase before inoculation is a determining factor in the biofilm formation. When *P. aeruginosa* is inoculated at a stationary phase, biofilm formation shows non-linear dependence on concentration of nutrients and on their total amount in the cultivation volume. The linear dependence of biofilm formation on concentration of nutrients in the culture medium is more pronounced, when *P. aeruginosa* is inoculated at a log phase. The study shows that lower concentrations of nutrient media components lead to more noticeable differences in biofilm formation, and such differences are statistically significant. Two-fold dilution of the liquid nutrient medium does not affect the intensity of biofilm formation; however, a 4 to 8-fold decrease in concentration of nutrients in 0.2 ml of cultivation volume inhibited the biofilms formation. In 1.0 ml of the culture medium, the biofilm forms evenly, and in 0.2 ml of 4–8-fold dilution of nutrient medium it grows slower. The slow growth rate is statistically significant. The cultivation volume is also of great importance. For example, cultures grown in 0.2 ml of nutrient medium at different concentrations of nutrients formed fewer biofilms than microorganisms cultivated in 1.0 ml. At the same time, when inoculating *P. aeruginosa* both at log and stationary growth phases, biofilm formation is more pronounced in wells containing more cultivation volume.

Keywords: biofilms, bacteria, *P. aeruginosa*, stationary growth phase, log growth phase

Acknowledgements: The results were obtained with the financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement number 075-15-2021-1085).

For citation: Mironova T. E., Cherepushkina V. S., Afonyushkin V. N., Davydova N. V., Koptev V. Yu., Dimova A. S. Studying formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown under different cultivation conditions. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 35–41. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-35-41.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Vasily N. Afonyushkin, Candidate of Science (Biology), Head of the Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, 630501, Russia, Novosibirsk Oblast, Novosibirsky Raion, Krasnoobsk, а/я 8, e-mail: lisocim@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших факторов персистенции и защиты микроорганизмов от иммунного ответа макроорганизма можно назвать способность образовывать биопленки [1–3]. Биопленка представляет собой сообщество микроорганизмов, прикрепленных либо к поверхности субстрата, либо друг к другу, окруженных экзополимерным матриксом – основным структурным компонентом биопленки. Фенотип бактерий, находящихся в составе биопленки, изменен по сравнению с одиночными планктонными клетками, трансформированы параметры роста и экспрессии специфических генов [4–7].

Пленка бактерий является живым, постоянно обновляющимся сообществом одного или нескольких видов микроорганизмов, при этом матрикс, который их окружает, выполняет функцию защиты от неблагоприятных воздействий окружающей среды, а также служит одним из факторов межклеточного общения. Свойства матрикса определяют взаимоотношения внутриклеточного сообщества и внешней среды [3, 6, 8, 9].

Более 95% всех микроорганизмов находятся в природных экосистемах в виде специфически органи-

зованных биопленок [5]. Одним из микроорганизмов, способных образовывать биопленки, является *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка, СГП, *P. aeruginosa*) – убиквитарный инфекционный агент, являющийся возбудителем ряда оппортунистических заболеваний. *P. aeruginosa* выявляют в крови при сепсисе в 20%, в мокроте при муковисцидозе в 70%, при госпитальных пневмониях до 70%, при интраабдоминальных инфекциях в 28% случаев, его доля в общей этиологической структуре внутрибольничных инфекций находится в пределах 20–30% [10].

Для *P. aeruginosa* характерна высокая устойчивость к антисептическим и дезинфицирующим веществам. Микроорганизм обладает широким спектром факторов патогенности, высоким эпидемическим потенциалом и уникальными адаптационными свойствами, способен снижать эффективность иммунного ответа организма [2, 11–14].

Бактерии в биопленках синтезируют альгинат (мукоидный экзополисахарид) и образуют экзополимерный альгинатный матрикс. Штаммы, способные продуцировать альгинат, обычно выявляют при хронических

инфекциях, к примеру на фоне муковисцидоза. Бактериальная пленка защищает микроорганизм, в том числе от факторов естественной резистентности организма (лимфоциты, фагоциты, естественное движение реснитчатого эпителия дыхательного тракта, антитела и др.). Также доказана роль систем quorum sensing в формировании биопленок у *P. aeruginosa* [1, 2, 14, 15].

Высокая частота встречаемости и огромная роль синегнойной палочки в возникновении большого количества инфекционных заболеваний, трудно поддающихся лечению, в частности из-за способности формировать биопленки, определяет актуальность данной работы.

В настоящее время опубликованы научные исследования, показывающие, что корреляция между ростом планктонной культуры и образованием биопленок существует, но не является абсолютной [2].

Новизна работы состоит в изучении феномена биопленкообразования при различных режимах культивирования *P. aeruginosa*, в частности, в зависимости от концентрации питательных веществ в объеме культивирования, а также используемой для посева фазы роста культуры.

Определяющими факторами при образовании биопленок в условиях микробиологических исследований являются: культуральные, ферментативные свойства и т. д. изучаемой микробиоты; условия культивирования (температура, состав среды, концентрация питательных веществ и т. д.); материал, на поверхности которого будет формироваться биопленка, и многое другое.

Целью данного исследования явилось изучение особенностей формирования биопленок культурой бактерий *P. aeruginosa* при различных режимах культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактерии. Изучение влияния условий культивирования на рост биопленок проводили на примере штамма бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, который был получен из коллекции музея сектора молекулярной биологии ИЭВСИДВ СФНЦА РАН.

Культивирование *P. aeruginosa* и бактериальных биопленок. Культуру *P. aeruginosa* ATCC 9027 выращивали в жидкой питательной среде LB-Luria (0,5 г/л NaCl; HiMedia) после предварительной серии пассажей при комнатной температуре на качалке в течение 6 и 24 ч. Пересев бульонной культуры производился каждые 24 ч.

Изучение влияния фазы роста бульонной культуры *P. aeruginosa*, объема питательной среды в лунке и концентрации питательных компонентов на формирование биопленок. Для оценки влияния фазы роста используемых для посева бактерий *P. aeruginosa* на образование биопленок проводили инокуляцию в питательную среду 6- и 24-часовой культуры в период логарифмической и стационарной фаз роста (прошедших серию пассажей в этой фазе культивирования). Затем приготовили разведение бульонной суспензии синегнойной палочки до значения 0,4 по стандарту МакФарланда в пропорции 100 мкл культуры на 10 мл питательной среды. Инокулюм был приготовлен путем внесения колоний штамма *P. aeruginosa* ATCC 9027 в стерильный физиологический раствор с последующим доведением плотности микробной суспензии до указанной концентрации.

Для оценки взаимного влияния объема и концентрации питательных веществ на интенсивность образования биопленок синегнойной палочкой используемые для культивирования жидкие питательные среды LB-Luria (0,5 г/л NaCl) и Шедлера (HiMedia) разводили физиологическим раствором до концентрации 50; 25; 12,5; 6% и вносили в лунки плоскодонных полистироловых планшетов в объемах 0,2 и 1,0 мл в четырех повторностях. Далее в лунки планшета погружали микропланшет с лунками, имеющими V-образное дно, и инокулировали бульонную культуру *P. aeruginosa*. Посевы инкубировали при температуре $(25,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч.

В качестве негативного контроля использовали питательные среды LB-Luria и Шедлера (HiMedia) без добавления микробного инокулята; контроль роста *P. aeruginosa* проводили в шести повторностях.

Метод окрашивания биопленок. Для оценки роста биопленок проводили их окрашивание генцианом фиолетовым (crystal violet) – красителем, связывающимся с клетками и матриксом биопленок, – по существующей методике [16] в модифицированной форме: после завершения культивирования не прикрепившиеся к поверхности лунок бактерии осторожно удаляли путем трехкратного промывания деионизированной водой. Биопленки, сформировавшиеся в лунках микропланшета, высушивали при комнатной температуре в течение 2 ч, фиксировали спиртом 40 мин и окрашивали 0,05%-м раствором генциана фиолетового 40 мин. Несвязавшийся краситель трехкратно отмывали 0,01 М фосфатно-солевым буфером с pH 7,2 (по 3 мин на одну промывку). Затем микропланшет с биопленками погружали в лунки полистиролового плоскодонного микропланшета с 200 мкл 96%-го этилового спирта для элюирования несвязавшегося красителя. Количественную оценку сформировавшихся биопленок проводили, определяя оптическую плотность с помощью планшетного спектрофотометра Tecan Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм (OD_{450}), по интенсивности окрашивания спирта экстрагированным красителем.

Статистическая обработка данных. Данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ Statistica 13.3. Статистическую значимость различий оценивали с использованием t-теста Стьюдента (критерий достоверности). Достоверными считали различия при уровне $p < 0,05$. Исследование взаимосвязи изучаемых параметров оценивали при помощи коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании исходили из гипотезы, рассматривающей синтез альгината *P. aeruginosa* в первую очередь в качестве фактора запасаания питательных веществ, необходимых для обеспечения энергетического обмена, в условиях дефицита питания, позволяющего обеспечивать рост культуры. Учитывая данную гипотезу, следует ожидать нелинейности характера образования биопленок при уменьшении количества и концентрации питательных веществ в культуральной среде.

Как свидетельствуют полученные результаты исследований, интенсивность формирования биопленок синегнойной палочкой различается в зависимости от концентрации питательных веществ, объема питательной среды в лунке и фазы роста культуры, используемой для посева. При уменьшении концентрации

Таблица 1
Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 при разных режимах культивирования, OD_{450} , $M \pm SD$ ($n = 4$)

Table 1
Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms under different cultivation conditions, OD_{450} , $M \pm SD$ ($n = 4$)

Фаза роста культуры <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027/ питательная среда	Объем питательной среды в лунках, мл							
	1,0				0,2			
	Концентрация питательных сред, %							
	50	25	12,5	6	50	25	12,5	6
Стационарная фаза/LB	0,16 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01***	0,15 ± 0,02***	0,08 ± 0,01***
Логарифмическая фаза/Шедлера	0,25 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,31 ± 0,05*	0,26 ± 0,07**	0,25 ± 0,03**	0,14 ± 0,02
Логарифмическая фаза/LB	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02**	0,11 ± 0,01

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

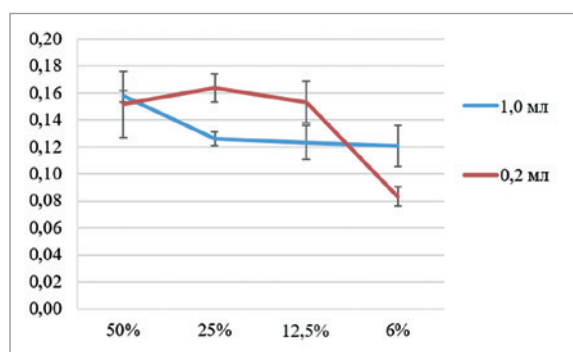


Рис. 1. Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 (посев культуры, выращенной до стационарной фазы) в лунках с объемом среды LB 0,2 и 1,0 мл и разной концентрацией питательных веществ, OD_{450} ($M \pm SD$)

Fig. 1. Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms (inoculation of culture grown up to a stationary phase) in wells containing 0.2 and 1.0 ml of LB medium and different concentrations of nutrients, OD_{450} ($M \pm SD$)

компонентов в питательных средах различия в образовании биопленок были более заметны и имели статистическую значимость (табл. 1).

При использовании для посева культуры синегнойной палочки, находящейся в стационарной фазе роста в течение 48 ч, процесс образования биопленки зависел только от концентрации питательных веществ в объеме культивирования (рис. 1). Так, при разбавлении среды LB в 2 раза объем культивирования не влиял на интенсивность роста биопленки. При 4–8-кратном разбавлении питательной среды *P. aeruginosa* формировала биопленку большей плотности при выращивании в лунках с 1,0 мл бульона, чем при выращивании в 0,2 мл среды ($p = 0,000232$ и $0,000129$ соответственно). В данном диапазоне концентраций питательной среды интенсивность образования биопленки была одинаковой и статистически значимо снижалась в объеме культивирования 0,2 мл в сравнении с культурой, выращиваемой в 1,0 мл питательной среды ($p = 0,000825$).

Представленные на рисунке 2 данные показывают, что при использовании в качестве посевного материала

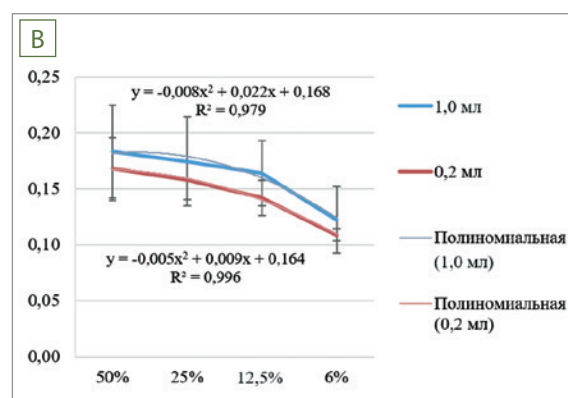
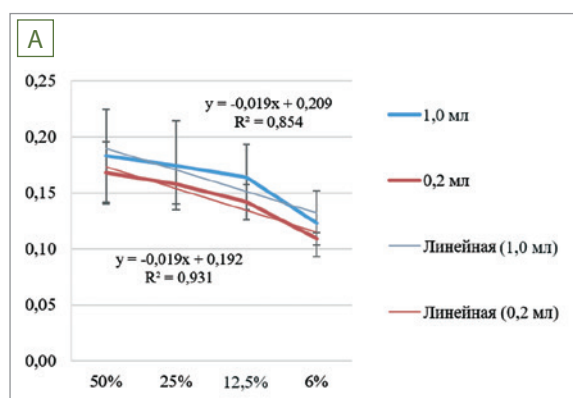


Рис. 2. Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 (посев культуры, выращенной до логарифмической фазы) в лунках с объемом среды LB 0,2 и 1,0 мл и разной концентрацией питательных веществ, OD_{450} ($M \pm SD$): А – линейный тренд; В – полиномиальный тренд

Fig. 2. Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms (inoculation of culture grown up to a log phase) in wells containing 0.2 and 1.0 ml of LBa medium and different concentrations of nutrients, OD_{450} ($M \pm SD$): A – linear trend; B – polynomial trend

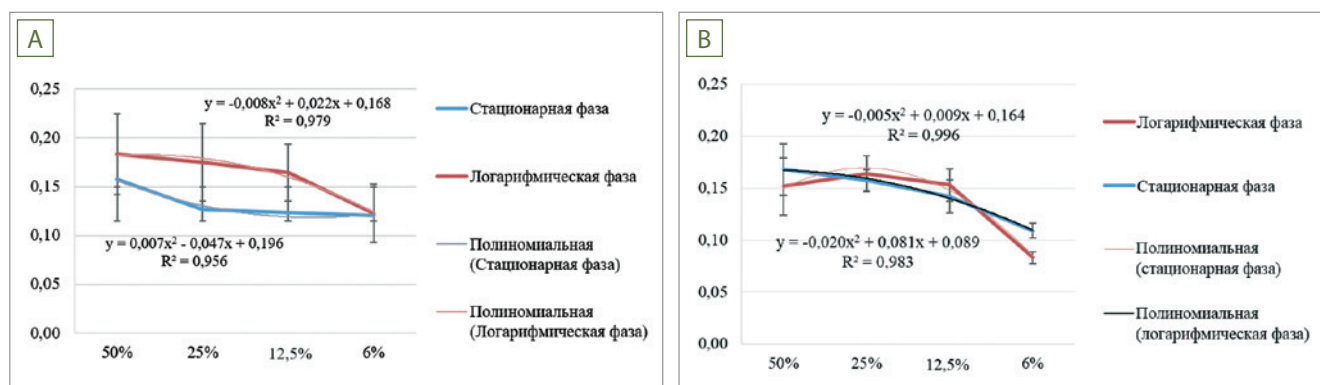


Рис. 3. Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 (посев культур, выращенных до логарифмической и стационарной фаз) в лунках с разным объемом среды LB и разной концентрацией питательных веществ, OD_{450} ($M \pm SD$): А – объем 1,0 мл; В – объем 0,2 мл

Fig. 3. Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms (inoculation of cultures grown up to log and stationary phases) in wells containing different volumes of LB medium and different concentrations of nutrients, OD_{450} ($M \pm SD$): А – 1.0 ml; В – 0.2 ml

ла *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста (прошедшей серию пассажей в этой фазе культивирования), на интенсивность биопленкообразования также влияла концентрация питательных веществ в среде Шедлера. Следует учесть, что объем культивирования 0,2 мл подразумевает 5-кратную разницу в общем содержании питательных веществ по сравнению с 1,0 мл. Соответственно, все кривые зависимостей не пересекались, образование биопленок в объеме культивирования 0,2 мл было закономерно меньше при всех концентрациях питательных веществ в сравнении с культурами, выращиваемыми в объеме 1,0 мл.

При разбавлении питательной среды в 8 раз наблюдается резкое снижение эффективности синтеза матрикса биопленок как при культивировании в объеме 1,0 мл, так и при выращивании в объеме 0,2 мл. Данный факт подтверждается тем, что зависимость образования биопленки от содержания питательных веществ точнее описывается двухстепенной полиномиальной функцией ($R^2 = 0,996-0,979$), чем линейной функцией ($R^2 = 0,854-0,931$).

Влияние используемой для посева фазы роста культуры *P. aeruginosa* на образование биопленок было наиболее выражено при культивировании в объеме 1,0 мл с использованием питательной среды LB, разбавленной в 4 и 8 раз ($p = 0,0209$ и $0,0053$ соответственно). Подобная зависимость не наблюдалась при культивировании данных бактерий в объеме 0,2 мл (рис. 3).

Закономерно, что метаболически более активная культура в логарифмической фазе роста эффективнее использовала компоненты питательной среды. При этом количество питательных веществ, извлеченных из объема культивирования 1,0 мл, было больше, чем из объема 0,2 мл.

Нелинейный характер образования биопленок во взаимосвязи с концентрацией и общим содержанием питательных веществ в среде культивирования позволяет предполагать связь биопленок с функцией запасаения и концентрации питательных веществ. Различия в интенсивности синтеза биопленок, связанные с фазой роста культуры при посеве, позволяют выдвинуть предположение о влиянии не только генетической изменчивости, но и допускают возможность

сохранения фенотипа за счет эпигенетических механизмов реакции quorum sensing у *P. aeruginosa*.

На основании данных, полученных при культивировании статических биопленок в жидких питательных средах, было сделано заключение о влиянии на биопленкообразование концентрации питательных веществ, объема среды и фазы роста культуры, используемой для посева.

Установлено, что определяющим фактором при формировании биопленок является фаза роста бактерий, в которой функционировала культура на момент инокуляции. При посеве *P. aeruginosa*, находящейся в стационарной фазе роста в течение 48 ч, образование биопленок нелинейно зависело от концентрации питательных веществ и от их общего количества в объеме культивирования. Разбавление питательной среды LB в 2 раза не оказывало влияния на рост пленки, в то время как 4–8-кратное снижение концентрации питательных веществ в объеме культивирования 1,0 мл стимулировало образование биопленок.

В объеме культивирования 1,0 мл интенсивность формирования биопленок была равномерной и не зависела от степени разбавления среды LB, а в объеме 0,2 мл статистически значимо снижалась при разведении в 4 и 8 раз.

Линейная зависимость образования биопленок от концентрации питательных веществ в среде культивирования Шедлера была более выражена при посеве *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста. Графики зависимости описывались линейной функцией с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,854-0,931$.

Культуры, выросшие в меньшем объеме культивирования (0,2 мл) при разных концентрациях питательных веществ, формировали биопленки меньшей плотности по сравнению с микроорганизмами, культивируемыми в объеме 1,0 мл.

При изучении влияния логарифмической и стационарной фаз роста культуры *P. aeruginosa* на образование биопленок было установлено, что формирование пленки более интенсивно протекало в объеме культивирования 1,0 мл. При этом метаболически более активная культура, инокулированная в логарифмической

фазе роста, использовала питательные вещества среды культивирования эффективнее.

Результаты исследования влияния концентрации и общего содержания питательных веществ в объеме культивирования на образование биопленок позволяют предположить наличие связи между формированием пленок и функцией запасаения и концентрирования питательных компонентов среды. При этом важно отметить наличие нелинейного характера формирования пленок, подтверждающего гипотезу о том, что в условиях дефицита питания для обеспечения своего роста способность *P. aeruginosa* синтезировать альгинат позволяет задерживать и поддерживать концентрацию питательных веществ, необходимых для роста популяции. Также вследствие исчерпания питательных веществ при накоплении продуктов метаболизма происходит ингибирование жизнедеятельности всех микроорганизмов, входящих в состав биопленки, при этом при низких концентрациях питательных веществ данный процесс закономерно снижается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования было установлено, что на формирование биопленок бактерией *P. aeruginosa* оказывает влияние как фаза роста культуры, используемая для посева, так и объем лунки для выращивания, а также концентрация питательных веществ, находящихся в объеме культивирования.

При изучении влияния фазы роста культуры, в которой функционировали микроорганизмы перед посевом на жидкие питательные среды, было установлено, что данный фактор имеет первостепенное значение. Как показали результаты определения оптических плотностей исследуемых образцов, при посеве *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста, линейная зависимость образования пленок от концентрации питательных веществ в объеме культивирования была более выражена в сравнении с культурой, функционирующей в фазе стационарного роста. В случае использования в качестве посевного материала *P. aeruginosa*, выращенной до стационарной фазы, наблюдали равномерный рост биопленок при разных концентрациях питательных компонентов в среде и объемах культивирования. Биопленкообразование бактерией, пребывающей в фазе логарифмического роста, в лунках объемом 0,2 мл при понижении концентрации питательных веществ (50, 25, 12,5 и 6%) в жидкой питательной среде Шедлера характеризовалось следующими показателями роста: $0,31 \pm 0,05$; $0,26 \pm 0,07$; $0,25 \pm 0,03$; $0,14 \pm 0,02$; в объеме культивирования 1,0 мл показатели роста пленок составили: $0,25 \pm 0,02$; $0,16 \pm 0,02$; $0,16 \pm 0,01$; $0,13 \pm 0,01$. При культивировании синегнойной палочки в жидкой питательной среде LB также отмечали выраженную линейную зависимость образования пленок от концентрации питательных веществ. В лунках объемом 0,2 мл показатели роста биопленок были следующими: при концентрации питательных сред 50% – $0,17 \pm 0,03$; при 25% – $0,16 \pm 0,02$; при 12,5% – $0,14 \pm 0,02$; при 6% – $0,11 \pm 0,01$. В лунках объемом 1,0 мл данные показатели имели следующие значения: при 50%-й концентрации среды – $0,18 \pm 0,04$; при 25%-й – $0,17 \pm 0,04$; при 12,5%-й – $0,16 \pm 0,03$; при 6%-й – $0,12 \pm 0,03$. Также установлено, что в объеме культивирования 1,0 мл интенсивность образования биопленок была равномерной, а в объеме 0,2 мл статистически значимо

снижалась при разведении питательной среды в 4 и 8 раз. При этом 4–8-кратное снижение концентрации питательных веществ в объеме культивирования 1,0 мл стимулировало образование биопленок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егорова О. Н., Брусина Е. В., Григорьев Е. В. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2014. 82 с. Режим доступа: https://mz19.ru/upload/iblock/7b6/2014_4_p.aerug_new.pdf.
2. Марданова А. М., Кабанов Д. А., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования: учебно-методическое пособие. Казань: К(П)ФУ; 2016. 42 с. Режим доступа: https://kpfu.ru/portal/docs/F1250326711/posobie._Bioplenki._Mardanova.AM.Kabanov.D.A.Sharipova.M.R.pdf.
3. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
4. Литвиненко З. Н. Влияние органических веществ на формирование биопленок в водных системах: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Хабаровск; 2015; 9–10. Режим доступа: <https://viewer.rusneb.ru/rl01005559845?page=1&rotate=0&theme=white>.
5. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (2): 167–193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
6. Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 2001; 183 (18): 5395–5401. DOI: 10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001.
7. Tetz V. V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med. Microbiol. Lett.* 1996; 5 (8): 426–436.
8. Маянский А. Н., Чеботарь И. В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 1: 101–108. eLIBRARY ID: 19059408.
9. Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 3: 99–109. eLIBRARY ID: 21064122.
10. Чеботарь И. В., Бочарова Ю. А., Маянский Н. А. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19 (4): 308–319. eLIBRARY ID: 32501810.
11. Cross A., Allen J. R., Burke J., Duce G., Harris A., John J., et al. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5 (Suppl 5): 837–845. DOI: 10.1093/clinids/5.supplement_5.s837.
12. Gibson R. L., Burns J. L., Ramsey B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168 (8): 918–951. DOI: 10.1164/rccm.200304-505SO.
13. Peleg A. Y., Hooper D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362 (19): 1804–1813. DOI: 10.1056/NEJMr0904124.
14. Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., Greenberg E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 2000; 407 (6805): 762–764. DOI: 10.1038/35037627.
15. Oglesby L. L., Jain S., Ohman D. E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154: 1605–1615. DOI: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
16. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28 (3): 449–461. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.

REFERENCES

1. Egorova O. N., Brusina E. V., Grigor'ev E. V. Epidemiologiya i profilaktika sinegnoinoi infektsii. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii = Epidemiology and prevention of pseudomonas infection. Federal clinical guidelines. Moscow: 2014. 82 p. Available at: https://mz19.ru/upload/iblock/7b6/2014_4_p.aerug_new.pdf. (in Russ.)
2. Mardanova A. M., Kabanov D. A., Rudakova N. L., Sharipova M. R. Bioplenki: osnovnye printsipy organizatsii i metody issledovaniya: uchebno-metodicheskoe posobie = Biofilms: basic principles of research and test methods: study guide. Kazan: K(P)FU; 2016. 42 p. Available at: https://kpfu.ru/portal/docs/F1250326711/posobie._Bioplenki._Mardanova.AM.Kabanov.D.A.Sharipova.M.R.pdf. (in Russ.)
3. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.

4. Litvinenko Z. N. Vliyaniye organicheskikh veshchestv na formirovaniye bioplenok v vodnykh sistemakh = Impact of organic substances on biofilms formation in aquatic systems: author's abstract of Candidate of Science (Biology) thesis. Khabarovsk; 2015; 9–10. Available at: <https://viewer.rusneb.ru/ru/rsl01005559845?page=1&rotate=0&theme=white>. (in Russ.)
5. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (2): 167–193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
6. Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 2001; 183 (18): 5395–5401. DOI: 10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001.
7. Tetz V. V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med. Microbiol. Lett.* 1996; 5 (8): 426–436.
8. Mayansky A. N., Chebotar I. V. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2011; 1: 101–108. eLIBRARY ID: 19059408. (in Russ.)
9. Romanova Yu. M., Gintsburg A. L. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2011; 3: 99–109. eLIBRARY ID: 21064122. (in Russ.)
10. Chebotar I. V., Bocharova Yu. A., Mayansky N. A. Mechanisms and regulation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2017; 19 (4): 308–319. eLIBRARY ID: 32501810. (in Russ.)
11. Cross A., Allen J. R., Burke J., Duce G., Harris A., John J., et al. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5 (Suppl 5): 837–845. DOI: 10.1093/clinids/5.supplement_5.s837.
12. Gibson R. L., Burns J. L., Ramsey B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168 (8): 918–951. DOI: 10.1164/rccm.200304-505SO.
13. Peleg A. Y., Hooper D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362 (19): 1804–1813. DOI: 10.1056/NEJMra0904124.
14. Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., Greenberg E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 2000; 407 (6805): 762–764. DOI: 10.1038/35037627.
15. Oglesby L. L., Jain S., Ohman D. E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology (Reading).* 2008; 154: 1605–1615. DOI: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
16. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28 (3): 449–461. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.

Поступила в редакцию / Received 17.08.2021

Доработана после рецензирования / Revised 28.09.2021

Принята к публикации / Accepted 25.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Миронова Татьяна Евгеньевна, аспирант ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, младший научный сотрудник сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Черепушкина Виктория Сергеевна, младший научный сотрудник сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Афонюшкин Василий Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий сектором молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Давыдова Наталия Владимировна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Коптев Вячеслав Юрьевич, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории болезней молодняка ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Димова Аlesia Сергеевна, доктор ветеринарных наук, доцент кафедры эпизоотологии и микробиологии ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, г. Новосибирск, Россия.

Tatyana E. Mironova, Post-Graduate Student, FSBEI HE Novosibirsk SAU, Junior Researcher, Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Victoriya S. Cherepushkina, Junior Researcher, Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Vasily N. Afonyushkin, Candidate of Science (Biology), Head of the Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Nataliya V. Davydova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Vyacheslav Yu. Koptev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diseases of Young Animals, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Alesya S. Dimova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Epizootology and Microbiology, FSBEI HE Novosibirsk SAU, Novosibirsk, Russia.