

Гаврилова И.А. Оценка влияния суббицидных доз полигуанидина на морфометрические параметры колоний и бактериальных клеток *Pseudomonas aeruginosa* методом атомно-силовой микроскопии / И.А. Гаврилова, Л.П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. под ред. проф. Г.М. Игнатьева. – Минск, 2011. – Выпуск 4. – С. 244-249

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУББИЦИДНЫХ ДОЗ ПОЛИГУАНИДИНА НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КОЛОНИЙ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

^{1,2}Гаврилова И.А., ¹Титов Л.П.

¹РНПЦ микробиологии и эпидемиологии; ²Белорусский государственный
медицинский университет, Минск, Беларусь

Резюме. В представленной работе оценивали изменения бактериальных клеток и колоний бактерий, а также чувствительность к дезинфицирующим средствам в серии пассажей с воздействием суббицидных концентраций дезинфектанта из группы гуанидинов. Выявлена вариабельность бактерий как на уровне отдельных клеток, так и на уровне бактериальной популяции. В результате воздействия стрессовых факторов (дезинфектанта) клетки округляются, становятся меньше по размеру, преобладают подвижные формы бактерий; наблюдается атипичное деление. Колонии становятся меньше по размеру, наблюдается слизееобразование. Представленные данные позволят расширить знания о закономерностях адаптации микроорганизмов в условиях стационара.

Ключевые слова: синегнойная палочка, резистентность к дезинфектантам, адаптация микроорганизмов, атомно-силовая микроскопия.

Введение. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – неферментирующая грамотрицательная палочковидная бактерия. Широко распространена в природе: встречается в почве, в воде, на растениях, в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Может встречаться как в биопленке, прикрепленной к какой-либо поверхности или субстанции (фиксированная форма существования), так и в планктонной форме (подвижная форма), т.е. в виде отдельной бактерии, передвигающейся с помощью своего полярного жгутика. Способна не только длительное время сохраняться в окружающей среде (влажной атмосфере или воде), но и успешно размножаться.

Синегнойная палочка является условно-патогенным для человека микроорганизмом, основное медицинское значение которого заключается в его способности вызывать различные гнойно-септические инфекции у пациентов стационаров, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Начиная с 70-х гг. XX века *P. aeruginosa* – один из доминирующих возбудителей внутрибольничных инфекций в мире. Это связано с наличием у *P. aeruginosa* многочисленных факторов вирулентности и самыми различными механизмами устойчивости, что и обуславливает потенциальную опасность и тяжесть инфекций, вызываемых данной бактерией [1]. Особенную опасность представляют так называемые госпитальные штаммы условно-патогенных микроорганизмов.

Доказано, что госпитальные штаммы многих видов микроорганизмов, в том числе и синегнойной палочки, могут формироваться вследствие селективного пресса антибактериальных препаратов, применяемых в клинических условиях, или переноса некоторых внехромосомных факторов наследственности [2, 3, 4].

Подобный механизм формирования госпитальных штаммов соответствует имеющимся сведениям о *P. aeruginosa* как о микроорганизме, способном легко воспринимать, эффективно экспрессировать гетерологичные гены и осуществлять их разнообразную реаранжировку [5].

Без понимания закономерностей формирования резистентных штаммов микроорганизмов невозможны поиск и разработка новых эффективных противомикробных средств. В связи с этим, представляет интерес характер изменений бактерий под воздействием субингибиторных концентраций дезинфицирующих средств как на уровне отдельных клеток, так и на популяционном уровне.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является перспективным методом, позволяющим исследовать особенности реальной структуры поверхности живых бактерий. Поскольку АСМ позволяет не только получать трехмерные изображения исследуемых объектов с высоким пространственным разрешением, но и оказывать на них локальное механическое воздействие, спектр приложений этого метода непрерывно расширяется.

В представленной работе оценивали изменения бактериальных клеток и колоний бактерий, а также чувствительность к дезинфицирующим средствам в серии пассажей с воздействием суббиоцидных концентраций дезинфектанта из группы гуанидинов.

Цель работы: изучить морфометрические показатели бактериальных клеток и колоний *P. aeruginosa* при воздействии субингибиторных концентраций дезинфектанта на основе полигексаметиленгуанидина.

Материалы и методы. Объектом исследования явились штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из внешней среды стационара хирургического профиля, чувствительные к большинству широко используемых дезинфектантов. Чувствительность бактерий к дезинфектантам определялась суспензионным методом с нейтрализацией дезинфектанта и последующим высевом на плотные питательные среды. При каждом пассировании проводилось воздействие дезинфектантом из группы гуанидинов (активно действующее вещество полигексаметиленгуанидина гидрохлорид) в суббиоцидных концентрациях. Диапазон концентраций биоцида от $1/32$ до $1/2$ рабочей концентрации препарата, экспозиция 30 мин. После экспозиции дезинфектант нейтрализовали и проводили высеv из нейтрализатора на чашки с питательной средой. Учёт результатов проводился на вторые сутки. Оценивались характер роста и внешний вид колоний. Фотографии колоний получены с помощью микроскопа Leica Microsystems (увеличение $\times 4$).

Для повторных пассажей отбирались колонии, выросшие после воздействия дезинфицирующего средства в максимальной концентрации. После каждого пятого пассажа культуру и исходную культуру замораживали в консерванте при -70°C . Проведен 21 пассаж.

Из исходного и полученного в результате селекции штаммов готовили образцы для атомно-силовой микроскопии. Бактерии переносили с поверхности агаризованной питательной среды в дистиллированную воду. Концентрацию бактерий в суспензии определяли по оптическому стандарту мутности, она составляла 10^9 /мл. На поверхность подложки из монокристаллического кремния, модифицированного полиэлектролитом наносили каплю бактериальной взвеси, инкубировали в закрытых чашках Петри при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем многократно отмывали подложку с бактериями дистиллированной водой. Атомно-силовую микроскопию проводили после естественного высыхания образцов на воздухе на микроскопе Veeco («Nanoscope 3D», США) в контактном режиме. Использовались контактные кантилеверы CSC38 (константы жесткости 0,36 Н/м). Анализ изображений проведён при помощи программного обеспечения «NanoScope (R) III (version 5.31R1)».

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием пакета программ STATISTICA 6.1 и GraphPad Prism 5. Вычисляли средние арифметиче-

ские значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Достоверность различий между статистическими параметрами определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. После первых двух пассажей рост микроорганизмов был обнаружен только при воздействии дезинфектанта в разведении $1/16 - 1/32$ рабочей концентрации. В результате пассирования нарастали показатели устойчивости бактерий к концентрации дезинфицирующего средства.

После 21-го пассажа исходный микроорганизм стал резистентным к минимальной рабочей концентрации дезинфицирующего средства при рекомендуемой экспозиции.

После четвертого пассажа отмечалось уменьшение размеров колоний. Внешне колонии стали более слизистыми. После десятого пассажа отмечался полиморфизм колоний по размеру. При сравнении колоний исходного и полученного в результате селекции штаммов, наблюдалось заметное уменьшение размеров колоний, колонии стали более влажными, слизистыми и блестящими, форма колоний и их цвет не изменились (рисунок 1).

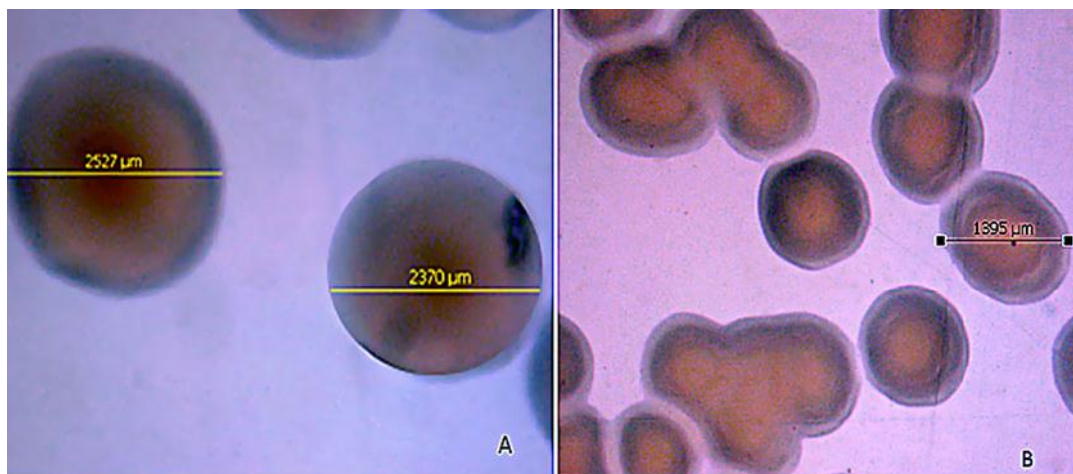


Рисунок 1 – Внешний вид колоний исходного (А) и полученного в результате селекции штамма *P. aeruginosa* (увеличение $\times 4$)

Изменение морфологии колоний подтверждает известный факт, что для синегнойной палочки свойственна выраженная диссоциативная изменчивость, которая помогает адаптироваться микроорганизму к меняющимся условиям среды обитания. Полагают, что возникновение мукоидных штаммов является следствием преимущественной селекции из гетерогенной популяции вариантов бактерий, способных к экспрессии синтеза внеклеточного альгината, который является важным фактором патогенности, участвуя в колонизации микроорганизмами различных биотопов человека [5].

Изучение бактериальной популяции методом атомно-силовой микроскопии показало наличие различий в морфологии клеток чувствительного исходного микроорганизма и микроба, полученного в результате селекции с использованием суббицидных концентраций дезинфектанта (рисунки 2, 3).

При анализе АСМ-фотографий исходной и полученной бактериальных популяций, обращает на себя внимание преобладание в изменённой при пассировании популяции бактериальных клеток, имеющих жгутики. Напротив, в исходной популяции у большинства клеток жгутики не определяются (рисунки 2, 3).

Подвижность играет важную роль в процессах колонизации, образования биоплёнок, в процессах адаптации бактериальной клетки к условиям внешней среды, и, как следствие, оказывает влияние на вирулентность патогенных штаммов. Для выживания

бактерии обладают способностью к быстрой адаптации в изменяющихся условиях. Механизмы этого процесса основаны на существовании многочисленных регуляторных сетей, которые дают возможность координированной регуляции экспрессии генов в ответ на сигналы окружающей среды.

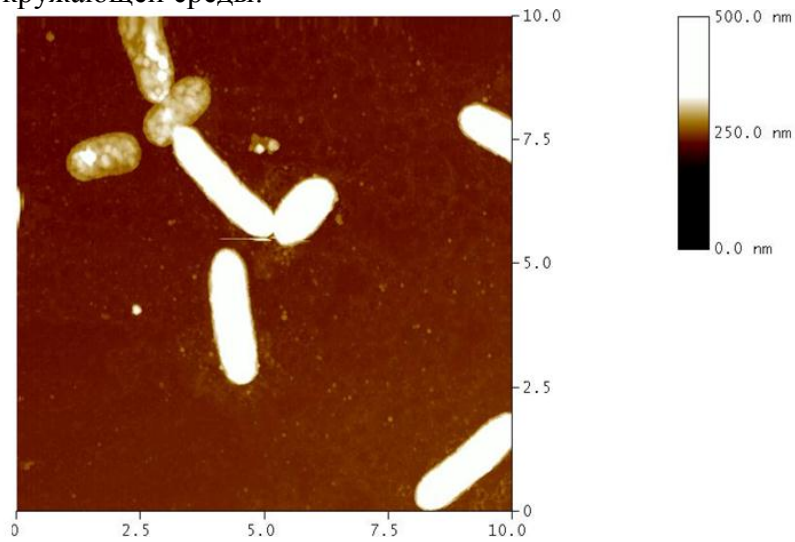


Рисунок 2 – АСМ-фотографии исходного штамма *P. aeruginosa*. Клетки бактериальной популяции вытянутые, палочковидные. Жгутики не определяются. Размер скана 10x10 мкм

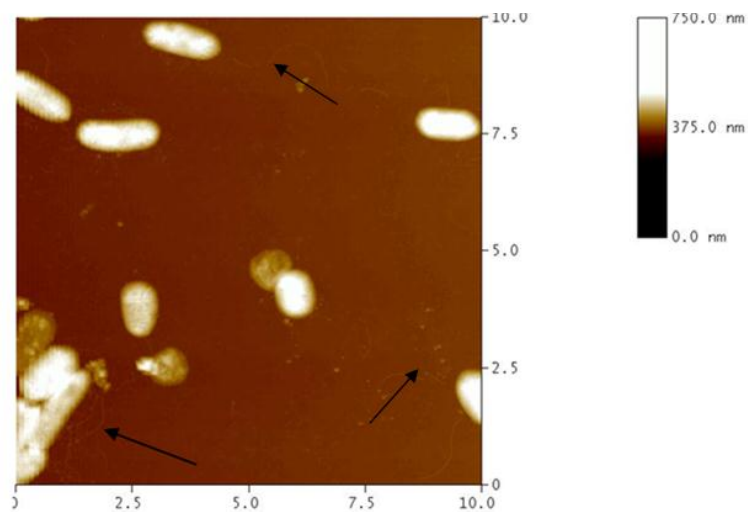


Рисунок 3 – АСМ-фотографии исходного штамма *P. aeruginosa*, полученного в результате пассирования с воздействием суббактерицидных концентраций дезинфектанта. Клетки бактериальной популяции полиморфны: палочковидные и округлые, определяются жгутики (указаны стрелками). Размер скана 10x10 мкм

Одним из примеров такой сложной регуляторной сети является система, ответственная за биосинтез и сборку жгутика. Эта система представляет собой сложную и жёсткую иерархическую структуру, которая требует согласованной работы приблизительно 50-ти генов, кодирующих структурные субъединицы, генов-операторов и генов-регуляторов. Кроме этого, в работе регуляторного каскада системы подвижности принимают участие моторные и хемотактические белки передачи сигнала. Таким образом, опероны жгутиковой системы организованы в иерархическом порядке в так называемый регулон, в котором экспрессия оперонов на данном уровне зависит от экспрессии оперонов вышестоящего уровня. Такая схема контроля позволяет координировать экс-

прессию генов со сборкой органеллы. В регуляции экспрессии участвуют также альтернативные сигма-факторы (σ -факторы) [6]. Они являются обязательным компонентом РНК-полимеразы – ключевого фермента транскрипции. Бактерии используют альтернативные σ -факторы, чтобы отрегулировать широкий диапазон физиологических процессов. Функциональные роли для альтернативных σ -факторов могут быть строго определенными (экспрессия генов споруляции) или разнообразными (регуляция ответа на стресс). У патогенных бактерий альтернативные σ -факторы часто оказывают влияние на вирулентность, в том числе, на экспрессию генов системы подвижности бактериальной клетки (σ^{28} , σ^{54} (*rpoN*) и σ^{70} -факторы синегнойной палочки). Альтернативный σ^{54} -фактор *P.aeruginosa* участвует в транскрипции генов с различными физиологическими функциями: гены системы жгутиков, гены пилинов, а также гены секреции мукоида (альгината). Транскрипционная активность σ^{54} -активаторов часто модулируется в ответ на изменения условий окружающей среды. *RpoN*-мутантные штаммы синегнойной палочки не образуют флагеллин и пилин (характеризуются снижением адгезии и неподвижностью) и демонстрируют сниженную вирулентность в многочисленных моделях инфекции [7]. Кроме того, мутации в гене *rpoN*, по-видимому, способствуют чрезмерной продукции альгината (*rpoN*-зависимый путь гиперсекреции альгината) [6].

Размер клеток (рисунок 4) исходного штамма колебался от 1,12 мкм до 3,1 мкм и составил в среднем 1,84-2,01 ($p \leq 0,05$). Размер бактерий полученного штамма колебался от 0,78 до 2,34 мкм ($p \leq 0,05$). Средний размер бактерий составил 1,46-1,59 мкм.

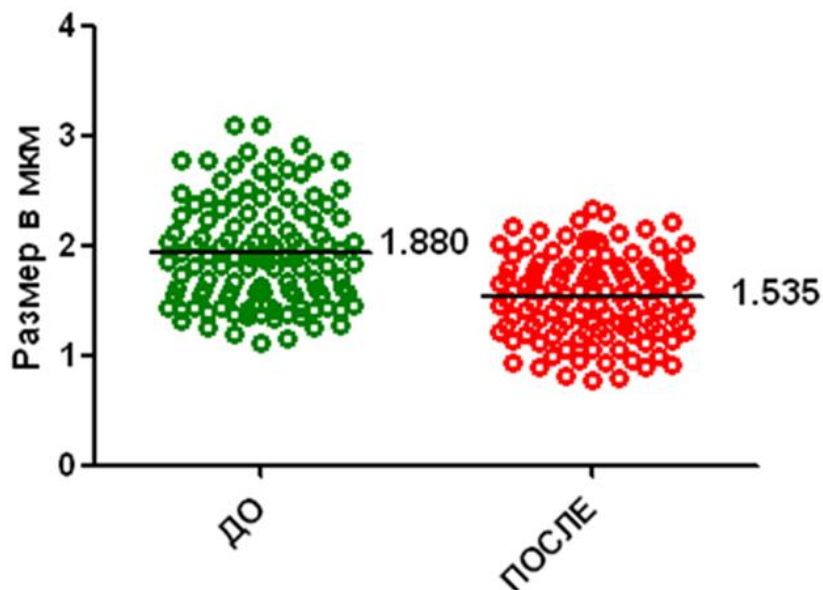


Рисунок 4 – Размеры бактерий исходного штамма и штамма, полученного после серии пассажей

Следует также упомянуть, что на АСМ-фотографиях, сделанных после десятого пассажа было отмечено атипичное деление бактериальной клетки синегнойной палочки с образованием впячиваний цитоплазматической мембраны в двух местах (рисунок 5).

Как известно, бесполое размножение бактерий осуществляется путем бинарного деления, которому предшествует репликация ДНК. Удвоение начинается с определенного участка этой молекулы, так называемой точки инициации. Фермент ДНК-полимеразы на каждой из них достраивает комплементарную полинуклеотидную цепь. Таким образом, возникают две молекулы ДНК, каждая из которых содержит одну «старую» цепь и одну вновь синтезированную цепь. Завершение репликации служит сигналом для начала формирования перегородки между дочерними клетками. При этом клеточная мембрана как бы «вращается» между образовавшимися молекулами ДНК,

разделяя их. Одновременно с ростом клеточной перегородки идет процесс ее расслаивания в центре, что обеспечивает каждую дочернюю клетку новой оболочкой. Возможно, что при воздействии стрессирующих факторов имеет место нарушение деления с образованием округлых покоящихся или некультивируемых форм.

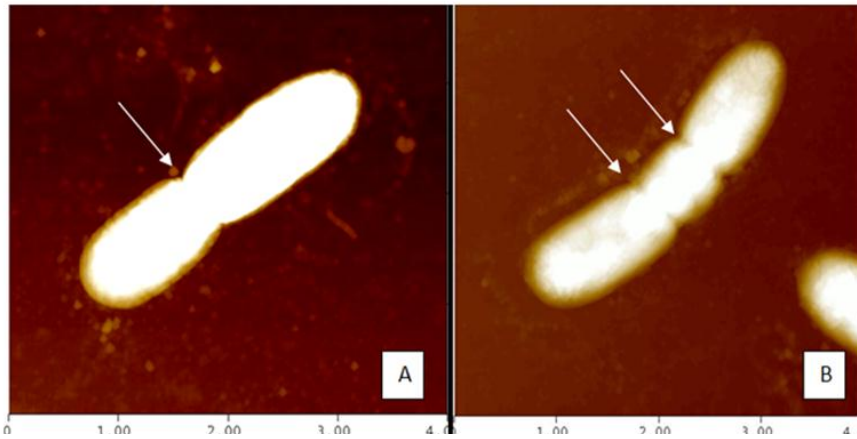


Рисунок 5 – АСМ-фотографии делящихся бактерий *P. aeruginosa*. А – бинарное деление; В – деление с образованием двух клеточных перегородок (культура после десятикратного воздействия суббактерицидных концентраций биоцида). Размер скана 4x4 мкм

Известно, что логарифмические культуры некоторых штаммов *E. coli* состоят исключительно из палочек, тогда как в стационаре они превращаются в сферические округлые клетки. В этом процессе активное участие принимает морфоген *bolA*, который принимает участие в реакциях адаптации к условиям стационарной фазы [8]. Хорошо известно, что клетки из стационарной фазы обычно более устойчивы, чем клетки из логарифмической фазы. Например, клетки некоторых микроорганизмов приобретали в стационаре устойчивость к различным летальным стрессам, в частности, к осмотическому и окислительному стрессам [9]. По-видимому, в случае с синегнойной палочкой имеет место схожий механизм адаптации, что доказывается наличием зрелых округлых бактериальных клеток, в том числе и в стадии деления (рисунок 6).

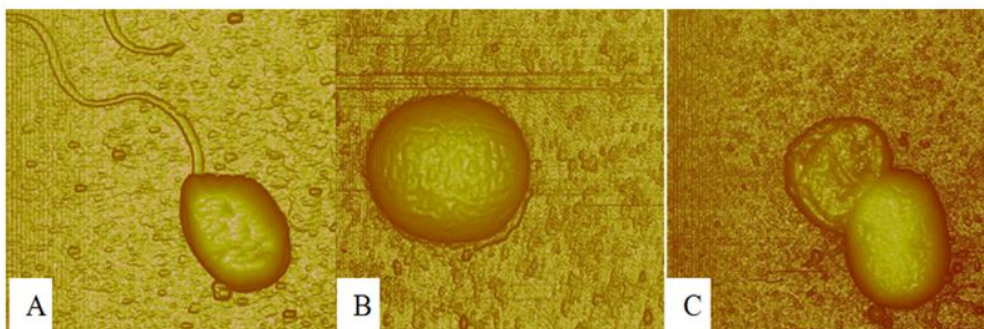


Рисунок 6 – округлые клетки *P. aeruginosa*. А (скан 4x4 мкм) – планктонная форма; В (скан 3x3 мкм) – фиксированная форма; С (скан 3x3 мкм) – деление бактерий

Заключение. Проведено изучение морфометрических показателей бактериальных клеток и морфологии колоний *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии субингибиторных концентраций дезинфектанта на основе полигексаметиленгуанидина.

Установлено, что суббиоцидные концентрации дезинфицирующих средств способствуют выживанию отдельных устойчивых клеток бактерий. При длительных воз-

действиях на микроорганизм субоптимальных концентраций дезинфектанта происходит формирование резистентности бактерий к данному дезинфектанту.

При формировании устойчивости к дезинфектанту отмечаются изменения культуральных свойств микроба (уменьшение размеров колоний, слизееобразование).

Атомно-силовая микроскопия бактериальных клеток показывает наличие фенотипических различий между чувствительными и резистентными к дезинфектантам микроорганизмами. Имеется вариабельность в морфологии и структурной организации бактериальных клеток. В результате воздействия стрессовых факторов (дезинфектанта) клетки округляются, становятся меньше по размеру, преобладают подвижные формы бактерий; наблюдается атипичное деление.

Литература

1. Руднов, В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* / В.А. Руднов // Рус. мед. журн. – 2005. – Т. 13, № 7. – С. 3-6.
2. Subinhibitory concentrations of the cationic antimicrobial peptide colistin induce the pseudomonas quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* / J. Cummins [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155, Pt. 9. – P. 2826-2837.
3. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter species* in the presence of organic material / К. Kawamura-Sato [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2008. – Vol. 61, N 3. – P. 568-576.
4. Russell, A.D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon / A.D. Russell // J. Hosp. Infect. – 2004. – Vol. 57, N 2. – P. 97-104.
5. Беляков, В.Д. Псевдомонады и псевдомонозы / В.Д. Беляков, Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
6. Tart, A.H. The alternative sigma factor algT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ / A.H. Tart, M.C. Wolfgang, D.J. Wozniak // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187. – P. 7955-7962.
7. Kazmierczak, M.J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence / M.J. Kazmierczak, M. Wiedmann, K.J. Boor // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2005. – Vol. 69. – P. 527-543.
8. Lange, R. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor σS (*rpoS*) / R. Lange, R. Hengge-Aronis // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173. – P. 4474-4481.
9. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase / M.J. Smeulders [et al.] // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 270-283.

Поступила 05.08.2011

EVALUATION OF INFLUENCE OF POLIGUANIDINE SUB-BIocide DOSES TO MORPHOMETRIC PARAMETERS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* COLONIES AND CELLS BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

^{1,2}Gavrilova I.A., ¹Titov L.P.

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

In the present study changes of bacterial cells and colonies, as well as sensitivity to disinfectants in a series of passages with the influence of the disinfectant concentration of the guanidines subbiocide group had been evaluated. Bacteria variability at the level of individual cell and at the level of bacterial populations had been found. As a result of stress factors (disinfectant) cells rounded, becoming smaller in size, bacteria mobile forms dominated, and their

atypical division had been observed. The colonies became smaller and produced mucus. The data presented could enhance knowledge about the microorganisms adaptation patterns in a hospital conditions.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, resistance to disinfectants, microorganism adaptation, atomic force microscope.