

Влияние хлоргексидина и Пронтосана на смешанную и моновидовые биоплёнки, образованные *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*

М. В. КУЗНЕЦОВА^{1,2}, Ю. А. ЕНЬЧЕВА^{1,3}, В. А. САМАРЦЕВ¹

¹ Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера Минздрава РФ, Пермь

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

³ Городская клиническая больница № 21, Пермь

Influence of Chlorhexidine and Prontosan on Dual Species and Monospecies Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

M. V. KUZNETSOVA, YU. A. ENCHEVA, V. A. SAMARTSEV

E. A. Vagner Perm State Medical University, Perm

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm

Municipal Clinical Hospital No. 21, Perm

Изучено действие двух антисептических препаратов — 0,5% раствора хлоргексидина биглюконата и Пронтосана® на биоплёнки, сформированные *in vitro* референтными штаммами *P.aeruginosa* ATCC®27853 и *S.aureus* ATCC®29213 в монокультуре и в ассоциации. С помощью атомно-силовой микроскопии показано, что под действием биоцидов происходят фенотипические изменения структурной организации бактериальных биоплёнок и морфологии sessильных клеток: кокки становились меньше по диаметру, палочки укорачивались. Достоверное изменение линейных размеров клеток сопровождалось увеличением шероховатости их поверхности, более выраженное для Пронтосана®. При оценке жизнеспособности клеток выявлено, что Пронтосан® подавлял жизнеспособность бактерий в смешанной и моновидовых биоплёнках, образованных как на гидрофильной, так и на гидрофобной абиотических поверхностях. В последнем случае уменьшалась и массивность биоплёнки во всех вариантах эксперимента.

Ключевые слова: *P.aeruginosa*, *S.aureus*, моновидовые и смешанные биоплёнки, хлоргексидин, Пронтосан®.

The effect of two antiseptics, i. e. chlorhexidine bigluconate 0.5% solution and Prontosan® on dual species and monospecies biofilms formed *in vitro* by the reference strains *P.aeruginosa* ATCC®27853 and *S.aureus* ATCC®29213 was examined. It was demonstrated by atomic force microscopy that under the biocide action there occurred phenotype changes of the structural organization of the bacterial biofilms and morphology of the sessile cells: the cocci were lesser in diameter and the rods were reduced. A reliable change of linear cell sizes was accompanied by increase of their roughness (Sq) that was more pronounced for Prontosan®. When assessing the cell viability it was found that Prontosan® inhibited the bacterial viability in mixed and monospecies biofilms formed on both hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces. In the latter case the biofilm biomass (determined by crystal violet assay) lowered in all the variants of the experiment.

Key words: *P.aeruginosa*, *S.aureus*, dual species and monospecies biofilms, chlorhexidine, Prontosan®.

Введение

Согласно современным представлениям одним из основных способов выживания бактерий во внешней среде и в организме хозяина является их способность к формированию многоклеточных структур — биоплёнок [1]. Биоплёнокообразование является важной медицинской проблемой, так как обуславливает затяжной или хронический характер заболеваний микробной этиологии [2—4]. Известно, что в «зрелых» биоплёнках бактерии защищены от влияния агрес-

сивных веществ, факторов иммунной системы человека и антибактериальных препаратов, что часто является основной причиной неэффективности последних [5, 6].

Один из основных механизмов защиты клеток в биоплёнках опосредован экстрацеллюлярным матриксом, который обеспечивает структурную стабильность биоплёнки и является естественным препятствием для доступа бактерицидных агентов к бактериям. Биополимерный макромолекулярный гидратированный матрикс состоит преимущественно из микробных компонентов (экзополисахаридов, белков и внеклеточной ДНК), но может включать и элементы внутренней среды макроорганизма, например иммуног-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13. Пермский ГМУ им. акад. Е. А. Вагнера

Таблица 1. Характеристики бактерий в биоплёнках, образованных на стекле смешанной и моновидовыми культурами *S.aureus* и *P.aeruginosa*

Вариант	Длина, мкм	Ширина, мкм	Диаметр, мкм	Sq, нм
<i>S.aureus</i>	—	—	1,10±0,08	105,2±32,4
<i>S.aureus</i> +ХГ	—	—	0,86±0,10*	150±26,5*
<i>S.aureus</i> +ПР	—	—	0,85±0,04*	370±37,0*,#
<i>P.aeruginosa</i>	2,81±0,22	0,90±0,05	—	138,3±44,3
<i>P.aeruginosa</i> +ХГ	1,69±0,13*	0,98±0,12*	—	169,5±11*
<i>P.aeruginosa</i> +ПР	1,37±0,17*,#	0,94±0,01*	—	207,2±27,5*,#
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	2,45±0,37	0,99±0,24	1,28±0,18	237,5±95,2
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ХГ	н/о	н/о	1,14±0,15	336,5±38*
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ПР	н/о	н/о	1,02±0,09	397,8±47,8*,#

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с контролем в соответствующем варианте (без обработки антисептиком); # — различия статистически значимы по сравнению с ХГ ($p \leq 0,05$).

лобулины [3]. Эти данные заставили по-новому рассматривать роль местно применяемых антисептиков, а также стимулировали разработку и использование в клинике комбинированных композиций, включающих как бактерицидные вещества, так и компоненты, разрушающие защитный матрикс биоплёнки [7, 8].

Staphylococcus aureus и *Pseudomonas aeruginosa* являются одними из наиболее значимых возбудителей хирургических инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Они часто обнаруживаются на катетерах и других внедрённых в организм медицинских устройствах, а также при раневой, в том числе ожоговой, инфекции [9—13]. Учитывая, что в патогенезе большей части инфекционных осложнений лежат процессы биоплёнкообразования, представляется важным оценить влияние на биоплёнки, сформированные *S.aureus* и *P.aeruginosa*, хлоргексидина и Пронтосана® — двух антисептиков, широко используемых в хирургической практике.

Цель работы: изучить морфометрические показатели смешанной и моновидовых биоплёнок, образованных *S.aureus* и *P.aeruginosa*, после воздействия хлоргексидина и Пронтосана®.

Материал и методы

В работе использовали референтные штаммы *S.aureus* ATCC®29213 и *P.aeruginosa* ATCC®27853, полученные из ФГБУ «Государственный институт стандартизации и контроля им. Л. А. Тарасевича» Минздрава России (Москва).

Биоплёнки выращивали на покровных стеклах (18×60 мм) в бульоне Лурия-Бертани (среда LB) в чашках Петри при температуре 37°C в течение 20 ч. Затем стекла 3-кратно отмывали 0,01 М фосфатно-буферной средой (ФБС, pH 7,2±0,2), погружали на 1 ч в 0,5% водный раствор хлоргексидина биглюконата или Пронтосан® (0,1% ундециленовый амидопропил-бетаин, 0,1% полиаминопропил бигуанид — полигексанид), 3-кратно отмывали ФБС и просушивали препараты на воздухе в течение 20 мин. Концентрация хлоргексидина была выбрана в соответствии с тем, что в данной концентрации антисептик наиболее часто используется в хирургической практике. Изучение биоплёнок проводили с помощью комбинированной системы, состоящей из атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Япония), в

лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета.

Подсчёт клеток и оценку их жизнеспособности выполняли после получения КЛСМ-изображений (0,12×0,12 мм), для чего биоплёнки предварительно окрашивали флуоресцентным красителем LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и 15 мин выдерживали в темноте. Количество жизнеспособных и нежизнеспособных клеток подсчитывали не менее чем в пяти полях после нанесения сетки на образец (размер ячеек 0,024×0,024 мм). Высоту биоплёнки определяли методом послойного КЛСМ-сканирования. Обработку КЛСМ-изображений осуществляли с использованием программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). Профили поверхности бактериальных биоплёнок изучали с помощью АСМ. Сканирование проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50—90 кГц и константой жёсткости 0,5—4,4 Н/м. Для определения линейных размеров клеток (диаметр для кокков, длина и ширина для палочек), характеристики структуры поверхности (шероховатость, Sq) и высоты биоплёнки получали двух- и трёхмерные топографические изображения бактерий. Обработку полученных изображений проводили с помощью программы Iog Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

Во втором случае биоплёнки получали по методу, описанному G.F.O'Toole и R.Kolter [14]. Суточные культуры бактерий стандартизовали до 2,0 по McFarland и разводили 1:100 в LB-бульоне. В лунки полистиролового 96-луночного плоскодонного планшета (Медполимер, Россия) вносили по 0,1 мл разведённой бульонной моновидовой культуры бактерий и 0,1 мл LB-среды, при получении смешанной биоплёнки — по 0,1 мл бульонных культур обоих видов. Биоплёнки выращивали статически в термостате при температуре 37°C в течение 20 ч. После удаления планктонной культуры в опытную часть лунок вносили раствор хлоргексидина или Пронтосан®, выдерживали 1 ч, 3-кратно отмывали ФБС. Биомассу биоплёнки оценивали по уровню экстракции этанолом 0,1% водного раствора генцианвиолета, который измеряли на микропланшетном ридере Benchmark Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 580 нм в единицах оптической плотности (Ед, ОП₅₈₀). Для оценки жизнеспособности клеток в биоплёнках последние 3-кратно отмывали, вносили в лунки 100 мкл ФБС и 5-кратно обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин при 37 кГц, поместив планшеты в ультразвуковую ванну Elma Ultrasonic 30S (Elma, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) после высева из последовательных десятичных разведений бактериальных суспензий на селективные среды: желточно-солевой агар для *S.aureus* и цетримидный агар (Sigma-Aldrich, США) для *P.aeruginosa*.

Таблица 2. Толщина и количество клеток в биоплёнках, образованных на поверхности стекла смешанной и моновидами культурами *S.aureus* и *P.aeruginosa*

Вариант	Толщина биоплёнки, мкм ¹	Количество клеток на единицу площади ²	
		жизнеспособные	всего
<i>S.aureus</i>	4,85±0,57	36,4±4,6	площадь
<i>S.aureus</i> +ХГ	3,76±0,34	3,4±1,7	площадь
	$p_{(1-2)} < 0,05$	$p_{(1-2)} < 0,05$	
<i>S.aureus</i> +ПП	3,27±0,85	0	90,2±17,5
	$p_{(1-3)} < 0,05$	$p_{(1-3)} < 0,05$	$p_{(1-3)} < 0,05$
		$p_{(2-3)} < 0,05$	$p_{(2-3)} < 0,05$
<i>P.aeruginosa</i>	4,04±1,22	39,3±12,3	53,5±14,4
			$p_{(1-4)} < 0,05$
<i>P.aeruginosa</i> +ХГ	н/о	0,8±0,6	12,8±4,8
		$p_{(4-5)} < 0,05$	$p_{(2-5)} < 0,05$
			$p_{(4-5)} < 0,05$
<i>P.aeruginosa</i> +ПП	н/о	1,6±1,1	3,2±2,3
		$p_{(3-6)} < 0,05$	$p_{(4-6)} < 0,05$
		$p_{(4-6)} < 0,05$	$p_{(5-6)} < 0,05$
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	6,16±0,12	23,8±8,3	119±23
	$p_{(1-7)} < 0,05$	$p_{(1-7)} < 0,05$	$p_{(1-7)} < 0,05$
	$p_{(4-7)} < 0,05$	$p_{(4-7)} < 0,05$	$p_{(4-7)} < 0,05$
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ХГ	3,44±0,23	5,7±4,3	59,8±24,7
	$p_{(7-8)} < 0,05$	$p_{(7-8)} < 0,05$	$p_{(7-8)} < 0,05$
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ПП	3,28±0,65	0	38,2±0,5
	$p_{(7-9)} < 0,05$		$p_{(7-9)} < 0,05$
			$p_{(8-9)} < 0,05$

Примечание. ¹ – определяли путём послойного сканирования слоев биоплёнки, предварительно окрашенной флюоресцирующей меткой Live/Dead®; ² – подсчитывали не менее чем в пяти полях после нанесения сетки на образец; н/о – не определяли.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2003 и STATISTICA 6.0. Показатели представлены в виде среднего арифметического и его ошибки ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин определяли с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

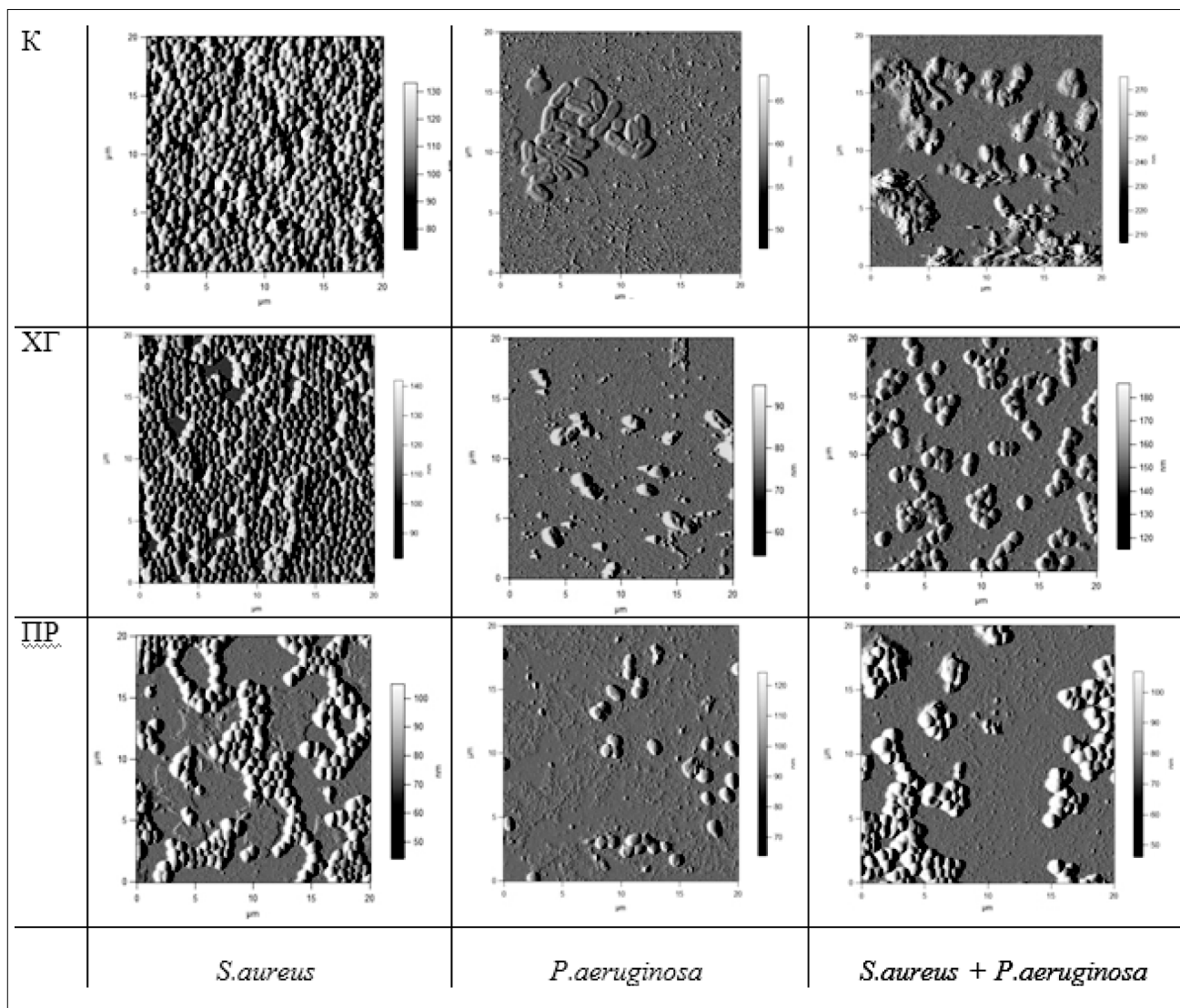
Результаты исследования

При анализе изображений, полученных с помощью АСМ, выявлено, что моновидавая биоплёнка, образованная на стекле референтным штаммом *S.aureus*, представлена хорошо разросшимися кокками (диаметр отдельных бактерий составил $1,10 \pm 0,08$ мкм) и имеет структуру плотно прилегающих друг к другу клеток (рисунок). Воздействие антисептиков изменяло размер клеток стафилококков, их диаметр становился достоверно меньше в обоих вариантах (табл. 1). После часовой обработки биоплёнок антисептиками появляются участки разряжения, более выраженные после контакта с Пронтосаном®, одним из компонентов которого является поверхностно-активное вещество, разрушающее биоплёночную структуру, обуславливая неравномерное распределение матрикса. Действительно, показатель Sq, характеризующий поверхность биоплёнки, образованной бактериями *S.aureus* на стекле, увеличивался в 1,4 и 3,5 раза после экспозиции с хлоргексидином (ХГ) и Пронтосаном® (ПП) соответственно (табл. 1), что отразилось и на толщине биоплёнки, которая статистически значимо уменьшалась (табл. 2). При оценке жизнеспособности клеток с помощью КЛСМ выявлено,

что бактерии в контрольной биоплёнке в основном живые, но после контакта с антисептиками большинство их становилось повреждёнными.

При выбранных условиях бактерии *P.aeruginosa* непрерывный монослой на стекле не формировали. На АСМ-изображении видны «многоклеточные островки», форма клеток чёткая, округлая, определяются жгутики, и большинство клеток в биоплёнке жизнеспособные (см. рисунок и табл. 2). После воздействия антисептиков бактерии располагались попарно или одиночно, морфологические параметры микробных клеток претерпевали существенные изменения: жгутики не визуализировались, клетки становились достоверно короче и толще — округлялись (табл. 1). Жизнеспособные клетки в биоплёнке практически не встречались. Шероховатость клеточной поверхности псевдомонадной биоплёнки после контакта с хлоргексидином и Пронтосаном® увеличивалась в 1,2 и 1,5 раза соответственно.

АСМ-изображение биоплёнки, сформированной при совместном росте двух штаммов бактерий, свидетельствует о том, что в её состав входят обе культуры, но преобладающий вид, кокковая или палочковидная микробиота, оценить не представлялось возможным из-за изменения морфологических параметров клеток (см. рисунок и табл. 1). Так, для палочковидных бактерий выявлена тенденция к укорочению и утолщению, для кокков — увеличение в диаметре, хотя изменения размеров



АСМ-изображение 20-часовой биоплёнки, образованной на стекле штаммами *S.aureus* и *P.aeruginosa* в моно- и микстварианте.

К – контроль (ФБС); ХГ – хлоргексидин; ПР – Пронтосан®.

клеток статистически не значимы. Структура биоплёнки разряженная, монослой не формируется, тем не менее выявляются многоклеточные скопления бактерий. После часовой обработки смешанной биоплёнки растворами антисептиков отдельные скопления бактерий на поверхности стекла сохраняются. При количественном подсчёте клеток после получения КЛСМ-изображений обнаружено снижение как общего числа бактерий, так и жизнеспособных клеток (см. табл. 2). При этом их диаметр достоверно уменьшался в варианте с Пронтосаном®, а типичные палочковидные клетки визуализировать не удалось. Показатель шероховатости поверхности полимикробной биоплёнки в большей степени увеличивался после контакта с Пронтосаном®, что было выявлено и для моновидовых культур. Необходимо отметить, что и в бинарном, и в моновидовых вариантах при КЛСМ-сканировании толщина

биоплёнки снижалась после обработки обоими антисептиками.

По результатам исследования влияния антисептиков на биоплёнки, сформированные референтными штаммами *S.aureus* и *P.aeruginosa* на гидрофобной поверхности в лунках полистиролового планшета, показано, что после воздействия Пронтосана® биомасса моновидовых биоплёнок уменьшалась в 1,9 и 7,4 раза соответственно, а смешанной биоплёнки — в 5,2 раза (табл. 3). Ни в одном из вариантов не выявлено снижения этого показателя после обработки хлоргексидином. При оценке жизнеспособности клеток в моновидовых биоплёнках обнаружено, что число КОЕ в контроле составило $9,25E+06 \pm 1,12E+06$ и $2,13E+07 \pm 0,53E+07$ для *S.aureus* и *P.aeruginosa* соответственно. После экспозиции биоплёнок с хлоргексидином количество жизнеспособных клеток для обоих видов

Таблица 3. Толщина и количество клеток в биоплёнках, образованных на поверхности полистирола смешанной и моновидовыми культурами *S.aureus* и *P.aeruginosa*

Вариант	Биомасса биоплёнки, Ед, ОП ₅₈₀ ¹	Количество клеток, КОЕ/мл
<i>S.aureus</i>	0,232±0,049	9,25E+06 ± 1,12E+06
<i>S.aureus</i> +ХГ	0,213±0,045	2,60E+03 ± 0,78E+03*
<i>S.aureus</i> +ПП	0,123±0,068*,**	0*,**
<i>P.aeruginosa</i>	0,547±0,066#	2,13E+07 ± 0,53E+07#
<i>P.aeruginosa</i> +ХГ	0,475±0,126#	2,67E+04 ± 0,36E+04*.#
<i>P.aeruginosa</i> +ПП	0,077±0,014*,**,#	0*,**
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	0,458±0,051#	S.a 1,70E+06 ± 0,27E+06 P.a 1,45E+07 ± 0,45E+07#
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ХГ	0,518±0,081	S.a 2,00E+03 ± 1,76E+03 P.a 2,13E+04 ± 0,74E+04*
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ПП	0,088±0,012*,**	0*,**

Примечание. ¹ – определяли спектрофотометрическим методом по элюированию 0,1% генцианвиолета; * – различия статистически значимы при сравнении с контролем в соответствующем варианте (без обработки антисептиком); ** – различия статистически значимы при сравнении с ХГ; # – различия статистически значимы при сравнении с *S.aureus* в аналогичных условиях (при $p \leq 0,05$).

бактерий снизилось на три порядка, а при воздействии Пронтосана® их не было выявлено ни в одном варианте. Данные, полученные для смешанной культуры, позволили констатировать, что в составе биоплёнки присутствовали обе культуры бактерий и клетки их оставались жизнеспособными (росли на желточно-солевом и цетримидном агаре). Аналогично моновидовым вариантам Пронтосан® полностью подавлял способность бактерий к росту на агаризованных селективных средах, тогда как при экспозиции с хлоргексидином в биоплёнках сохранялись жизнеспособные клетки обоих штаммов.

Обсуждение результатов

Бактерии *S.aureus* и *P.aeruginosa* являются сильными антагонистами, тем не менее ассоциации данных видов часто встречаются при муковисцидозе, осложнённом инфекционным процессом [15–17], и в раневом отделяемом больных ожоговых и реанимационных отделений [12, 18]. В многочисленных работах показан выраженный антибактериальный эффект хлоргексидина и полигексанида, а также препаратов на его основе, таких как Пронтосан®, в исследованиях *in vivo* [19–21]. Изучение влияния различных антибактериальных веществ на биоплёнки *in vitro* позволяет проводить качественный и количественный анализ с различными моновидовыми и смешанными культурами, сравнивать несколько препаратов между собой, определять механизмы их действия. Использование АСМ и КЛСМ при решении вопросов, связанных с характеристикой/оценкой морфологических особенностей бактериальных клеток при воздействии различных факторов, в том числе в составе биоплёнок, является актуальным направлением развития современных методов микробиологического анализа [22–25].

Проведённое исследование позволило получить новую информацию о влиянии хлоргексиди-

на и Пронтосана® на биоплёнки, образованные референтными штаммами *S.aureus* и *P.aeruginosa*, в том числе в смешанном сообществе. Показано изменение структурной организации бактериальных биоплёнок и морфологии сессильных клеток (кокки становились меньше по диаметру, а палочки укорачивались) после воздействия антисептических препаратов. Достоверное изменение линейных размеров клеток сопровождалось увеличением шероховатости их поверхности, более выраженное для Пронтосана®. Интересно, что под действием биоцидов на основе алкилдиметилбензиламмония хлорида и полигексаметиленгуанидина морфоструктурные изменения бактерий *P.aeruginosa* несколько отличались от выявленных нами: И. А. Гавриловой и соавт. показано, что увеличение поперечных размеров клеток синегнойной палочки сопровождалось увеличением и их длины [26]. Авторы объясняют этот феномен утратой бактериями формообразующих свойств под действием биоцида.

Бактерицидный эффект хлоргексидина при выбранных в данном исследовании условиях (на стекле, полистироле) проявлялся в отношении как *S.aureus*, так и *P.aeruginosa*. Механизм действия хлоргексидина двойной: в низких (антисептических) концентрациях он способен изменять структуру фосфолипидной мембраны, вследствие чего нарушается её целостность, возникает смещение осмотического равновесия и гибель клетки; в высоких концентрациях (как дезинфектант) хлоргексидин вызывает «затвердевание» цитоплазмы — осаждение белков и нуклеиновых кислот [27]. Полигексанид принадлежит к той же группе, что и хлоргексидин, но отличается отсутствием двух фрагментов *n*-хлоранилина и количеством активных участков в молекуле, а этот параметр играет важную роль в антимикробной активности антисептика [28]. Более выраженный эффект Пронтосана® на количество клеток в би-

оплётке и их жизнеспособность связан с действием амидопропил-бетаина, приводящего к её «разрыхлению», уменьшению количества внеклеточного матрикса, что увеличивает доступность антибактериального компонента к клеткам внутренних слоев биоплёнки. Это объясняет различия в бактерицидном действии антисептиков: Пронтосан® полностью подавлял жизнеспособность клеток в смешанной и моновидовых биоплёнках, образованных как на гидрофильной (за исключением одного варианта), так и гидрофобной абиотических поверхностях.

Тот факт, что не все клетки в составе биоплёнки погибают после воздействия на неё антибактериальных веществ, установлен рядом исследователей. Так, в работе К. Smith и I. S. Hunter показано, что до 11% бактерий *S.aureus* (на дисках из нержавеющей стали) и до 80% клеток *P.aeruginosa* (на тефлоновых и полиэтиленовых дисках) оставались в биоплёнках жизнеспособными после воздействия раствора хлоргексидина, который использовали в дезинфицирующей концентрации [29]. Р. С. Vonez и соавт., протестировали активность хлоргексидина в отношении планктонных и sessильных клеток различных видов бактерий, также констатировали меньшую эффективность антисептика на биоплёночный фенотип *P.aeruginosa* и *S.aureus* (наряду с *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii*) [30]. Выявленная устойчивость клеток к антисептикам может быть связана с фильтрующей способностью матрикса, заполняющего межклеточное пространство и затрудняющего доставку средства во внутренние слои биоплёнки [31]. У *P.aeruginosa* механизмы устойчивости могут быть опосредованы также изменением структуры липополисахаридного слоя, что ограничивает внедрение биоцидов, или активным выведением антибиотика (эффлюксом), осуществляемым за счёт гиперэкспрессии мембранной MexCD-Opj помпы [32, 33].

Выживаемость бактерий под влиянием антибиотиков и антисептиков определяет эффективность терапии при инфекционных осложнениях. Поэтому исследования, связанные с оценкой жизнеспособности клеток в биоплёнках, широко проводятся в бактериологических лабораториях различных стран, а используемые методы разнообразны, но не всегда стандартизованы [34]. Для определения чувствительности sessильных культур к антибиотикам предложен показатель «минимальная биоплёноко-элиминирующая концентрация» (МБЭК), характеризующий полную гибель бактерий, образующих биоплёнку [35]. Методика выявления жизнеспособности клеток в составе биоплёнок с помощью КЛСМ краткосрочна, но требует дорогостоящего оборудования, а увеличение экспозиции препарата с красителем может сместить равновесие в сторону нежизнеспособ-

ных бактерий. Кроме того, универсальность и надёжность пропиция йодида, широко используемого в подобных исследованиях, в последнее время подвергается сомнению [36]. В нашей работе гетерогенность морфологических свойств клеток обоих видов, сформированная под влиянием антисептиков, не позволила выявить доминирующую культуру и жизнеспособность клеток в смешанной биоплёнке с помощью АСМ и КЛСМ. При применении метода прямого высева бактериальной суспензии на селективные среды после ультразвуковой обработки модельной бинарной биоплёнки было установлено, что в её составе присутствуют жизнеспособные бактерии обоих видов с некоторым преимуществом *P.aeruginosa*, которое сохраняется и после экспозиции с хлоргексидином.

Известно, что в биоплёнках конкуренция между различными видами микроорганизмов обнаруживается крайне редко из-за низкой метаболической активности клеток, в том числе из-за снижения влияния антибактериальных веществ, и в большинстве случаев жизнеспособность сохраняют все виды [37–39]. Бактерии *S.aureus* и *P.aeruginosa*, колонизирующие лёгкие, вынуждены вступать в ассоциативное взаимодействие, что обуславливает их защиту от влияния факторов макроорганизма [16]. L.Yang и соавт. показали, что дикий тип *P.aeruginosa* PAO1 облегчает формирование микроколоний *S.aureus* при совместном культивировании и защищает *S.aureus* от фагоцитоза *Dictyostelium discoideum* в биоплёнке [17].

В лунках полистиролового планшета биомасса биоплёнки, образованной штаммом *P.aeruginosa*, была существенно выше, чем у *S.aureus*, и сравнима с биомассой полимикробной биоплёнки. Необходимо подчеркнуть, что количество входящих в моновидовые биоплёнки клеток было сопоставимо между культурами, но в бинарной — число бактерий *P.aeruginosa* было на порядок выше. Массивность псевдомонадной биоплёнки, по-видимому, обуславливал высокий уровень матриксного компонента в её составе. Подобное предположение подтверждается и анализом толщины образованной на стекле биоплёнки с помощью комбинированной системы микроскопирования, когда при сканировании поверхности выявлено существенное различие показателя — 200 нм для *P.aeruginosa* против 100 нм для *S.aureus* (данные не представлены), которое отсутствует при послойном сканировании. Массивность биоплёнки, сформированной на гидрофобной поверхности, во всех вариантах статистически значимо уменьшалась только при действии Пронтосана®. Ранее в исследовании на клинических изолятах также показано уменьшение биомассы моновидовых биоплёнок для обеих культур в 75% случаях и в 100% — для биоплёнок

из ассоциации бактерий *P.aeruginosa* и *S.aureus*. Хлоргексидин не оказывал подобного эффекта в отношении клинических изолятов *P.aeruginosa*, тем не менее выявлено снижение биомассы моновидовой биоплёнки у трети штаммов *S.aureus* [40]. Для некоторых культур показано, что экспозиция с хлоргексидином приводила к увеличению этого показателя. Данный феномен может быть связан с тем, что под действием антисептика происходит лизис поверхностных клеток, содержимое которых (протеазы, лиазы, ДНК-азы) «разрыхляет» биоплёнку, что способствует проникновению и удержанию красителя, обеспечивая ложное увеличение показателя биомассы биоплёнки при данном методе оценки.

Заключение

Инфекции, ассоциированные с образованием биоплёнки, могут быть результатом колонизации биотопов организма хозяина как моновидовой, так и смешанной культурой бактерий. Межвидовые взаимоотношения различных микроорганизмов в биоплёнках, в том числе механизмы устойчивости сложных мультивидовых сообществ к действию антимикробных веществ, до конца не объяснены. Совершенствование техники микроскопирования и комплексное применение КЛСМ и АСМ позволяют с большей эффективностью изучать феномен биоплёнокообразования бактерий, а именно оценивать жизнеспособность клеток, особенности структуры поверхности, архитектонику, клеточный и матриксный компоненты биоплёнки.

Полученные в работе данные показали негативное влияние двух наиболее часто применяемых в хирургической практике антисептиков на sessильные формы бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* в

смешанном и моновидовых вариантах. Применение АСМ при изучении бактериальных биоплёнок позволило оценить их фенотипические изменения под действием антисептических препаратов, а именно варибельность морфологии клеток бактерий и структурных изменений клеточной поверхности. В результате воздействия биоцидов клетки становились меньше по размеру или округлялись, шероховатость поверхности увеличивалась. Дезорганизация поверхностных клеточных структур происходила под влиянием обоих антисептиков, но при воздействии Пронтосана® показатель шероховатости увеличивался более значимо. Сходные данные показаны и при оценке жизнеспособности бактерий: использование Пронтосана® дало лучший антибактериальный эффект в отношении sessильных клеток двух основных возбудителей раневых инфекций.

Понятно, что в естественных условиях и искусственных системах «поведение» бактериальных биоплёнок, в том числе в контексте эффективности антибактериальных и антисептических препаратов, может существенно различаться. Тем не менее изучение влияния биоцидов на клеточный и матриксный компоненты бактериальных биоплёнок *in vitro* важно с точки зрения понимания механизмов, способствующих их разрушению/удалению, и выработки новых методов лечения инфекционных заболеваний, ассоциированных с биоплёнками.

Авторы выражают благодарность чл.-корр. РАН, д.б.н., профессору, зав. лабораторией ЛАМ ИЭГМ УрО РАН И. Б. Ившиной и сотрудникам лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета к.б.н. Е. В. Рубцовой и аспиранту И. О. Коршуновой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Романова Ю.М., Гицибург А.Л. Бактериальные биоплёнки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина. Журн микробиол эпидемиол и иммунобиол 2011; 3: 99–109. / Romanova Ju.M., Gincburg A.L. Bakterial'nye bioplenki kak estestvennaja forma sushhestvovanija bakterij v okruzhajushhej srede i v organizme hozjaina. Zhurn mikrobiol jepidemiol i immunobiol 2011; 3: 99–109. [in Russian]
2. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции. Журн инфектол 2010; 2: 3: 4–15. / Gostev V.V., Sidorenko S.V. Bakterial'nye bioplenki i infekcii. Zhurn infektol 2010; 2: 3: 4–15. [in Russian]
3. Costerton W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J Clin Invest 2003; 112: 1466–1477.
4. Mengi S., Vohra P., Sawhney N., Singh V.A. Biofilms: a diagnostic challenge in persistent infections. Int J of Research in Medical and Health Sciences 2013; 2: 3: 22–27.
5. Hoiby N., Ciofu O., Johansen H.K., Song Z.J., Moser C., Jensen P.O. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. Int J Oral Sci 2011; 3: 2: 55–65.
6. Stewart P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol 2002; 292: 107–113.
7. Гаврилова И.А., Титов Л.П. Оценка влияния суббиоцидных доз полигуанидина на морфометрические параметры колоний и бактериальных клеток *Pseudomonas aeruginosa* методом атомно-силовой микроскопии. Современные проблемы инф патологии человека: сборник научных трудов / Под ред. проф. Г.М. Игнатъева. 2011; 4:

244–249. / Gavrilova I.A., Titov L.P. Ocenka vlijanija subbioicidnyh doz poliguandina na morfometricheskie parametry kolonij i bakterial'nyh kletok *Pseudomonas aeruginosa* metodom atomno-silovoj mikroskopii. Sovremennye problemy inf patologii cheloveka: sbornik nauchnyh trudov / Pod red. prof. G.M. Ignat'eva. 2011; 4: 244–249. [in Russian]

8. Зверьков А.В., Зузова А.П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. Клин микробиол и антимикроб химиотер 2013; 15: 4: 279–285. / Zver'kov A.V., Zuzova A.P. Hlorgeksidin: proshloe, nastojashhee i budushhee odnogo iz osnovnyh antiseptikov. Klin mikrobiol i antimikrob himioter 2013; 15: 4: 279–285. [in Russian]
9. Бережанский Б.В., Жевнерев А.А. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока. Клин микробиол антимикроб химиотер 2006; 8: 2: 130–144. / Berezhanskij B.V., Zhevnerov A.A. Kateter-associirovannye infekcii krovotoka. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2006; 8: 2: 130–144. [in Russian]
10. Божикова С.А., Краснова М.В., Полякова Е.М., Рукина А.Н., Шабанова В.В. Способность к формированию биоплёнок у клинических штаммов *S.aureus* и *S.epidermidis* — ведущих возбудителей ортопедической имплант-ассоциированной инфекции. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014; 16: 2: 149–156. / Bozhkova S.A., Krasnova M.V., Poljakova E.M., Rukina A.N., Shabanova V.V. Sposobnost' k formirovaniju biopljonok u klinicheskikh shtammov *S.aureus* i *S.epidermidis* — vedushhih vozбудitelej ortopedicheskoj implant-associirovannoj infekcii. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2014; 16: 2: 149–156. [in Russian]
11. Гординская Н.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Дударева Е.В., Скленова Е.Ю., Некаева Е.С. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности возбудителей раневой ожоговой инфекции.

- Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 14: 4: 342—346. / *Gordinskaja N.A., Sabirova E.V., Abramova N.V., Dudareva E.V., Skleenova E.Ju., Nekaeva E.S.* Fenotipicheskie i molekularno-geneticheskie osobennosti vozбудitel'j ranevoj ozhogovoj infekcii. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2012; 14: 4: 342—346. [in Russian]
12. *Шуницына И.В., Осипова Е.В.* Биоплёнокообразующая способность выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом штаммов *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* и их ассоциаций, полученных *in vitro*. Успехи современного естествознания 2014; 11: 18—21. / *Shupitsyna I.V., Osipova E.V.* Bioplenkoobrazujushhaja sposobnost' vydelennyh iz ran bol'nyh hronicheskim osteomielitom shtammov *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* i ih associacij, poluchennyh *in vitro*. Uspеhi sovremennogo estestvoznanija 2014; 11: 18—21. [in Russian]
 13. *Mulcahy L.R., Isabella V.M., Lewis K.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. Microb Ecol 2013; 6: 76—79.
 14. *O'Toole G.F., Kolter R.* Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 1998; 30: 295—304.
 15. *Васильева Т.Г., Шишацкая С.Н., Павлова Я.Е.* Некоторые аспекты поражения органов дыхания и желудочно-кишечного тракта при муковисцидозе у детей. X Нац. конгресс «Муковисцидоз у детей и взрослых» 2011; 91—97. / *Vasil'eva T.G., Shishackaja S.N., Pavlova Ja.E.* Nekotorye aspekty porazhenija organov dyhanija i zheludochno-kishhechnogo trakta pri mukoviscidoze u detej. H Nac. kongress «Mukoviscidoz u detej i vzroslyh» 2011; 91—97. [in Russian]
 16. *Fugère A., Lalonde Séguin D., Mitchell G., Déziel E., Dekimpe V., Cantin A.M. et al.* Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. PLoS One 2014; 23: 9 (1):e86705.
 17. *Yang L., Liu Y., Markussen T., Høiby N., Tolker-Nielsen T., Molin S.* Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 62: 339—347.
 18. *Бондаренко Е.В., Лана Т.М., Сергеева Л.Г., Деметьева Л.М.* Анализ распространённости инфекций, вызванных синегнойной палочкой, в хирургических отделениях БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1. Инфекция и иммунитет 2012; 2: 1: 2: 473—474. / *Bondarenko E.V., Lapa T.M., Sergeeva L.G., Dement'eva L.M.* Analiz rasprostranennosti infekcij, vyzvannyh sinegnojnoj palochkoi, v hiruricheskikh otdelenijah BUZ VO «Voronezhskaja oblastnaja klinicheskaja bol'nica № 1. Infekcija i immunitet 2012; 2: 1: 2: 473—474. [in Russian]
 19. *Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Крутиков М.Г., Тушинова С.А., Кашин Ю.Д., Лагвилава М.Г.* Опыт применения полигексанида для местного лечения инфицированных ожоговых ран. Consilium med Hirurgija 2006; 1: 55—58. / *Alekseev A.A., Bobrovnikov A.E., Krutikov M.G., Tushinova S.A., Kashin Ju.D., Lagvilava M.G.* Opyt primeneniya poligeksanida dlja mestnogo lechenija inficirovannyh ozhogovyh ran. Consilium med Hirurgija 2006; 1: 55—58. [in Russian]
 20. *Харитонов Ю.М., Фролов И.С.* Новые технологии в лечении больных одонтогенной гнойной инфекцией. Фундаментальные исследования 2014; 7: 582—584. / *Haritonov Ju.M., Frolov I.S.* Novye tehnologii v lechenii bol'nyh odontogennoj gnojnoj infekciej. Fundamental'nye issledovanija 2014; 7: 582—584. [in Russian]
 21. *Чмырёв И.В., Скворцов Ю.Р., Кичемасов С.Х.* Использование Пронтосана после поздней некрэктомии при глубоких ожогах. Вестник национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова 2010; 5: 2: 49—54. / *Chmyrjov I.V., Skvorcov Ju.R., Kichemasov S.H.* Ispol'zovanie Prontosana posle pozdnej nekrjektomii pri glubokih ozhogah. Vestnik nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N.I. Pirogova 2010; 5: 2: 49—54. [in Russian]
 22. *Дерябин Д.Г., Васильченко А.С., Никитян А.Н.* Исследование воздействия ампициллина на морфологические и механические свойства клеток *Escherichia coli* и *Bacillus cereus* с использованием метода атомно-силовой микроскопии. Антибиотики и химиотер 2011; 7: 8: 7—12. / *Derjabin D.G., Vasil'chenko A.S., Nikijan A.N.* Issledovanie vozdejstvija ampicillina na morfologicheskie i mehanicheskie svojstva kletok *Escherichia coli* i *Bacillus cereus* s ispol'zovaniem metoda atomnosilovoj mikroskopii. Antibiotiki i himioter 2011; 7: 8: 7—12. [in Russian]
 23. *Ерохин П.С.* Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы. Автореф. дисс. к. физ.-мат. н. Саратов. 2015: 23. / *Erohin P.S.* Atomno-silovaja mikroskopija kak instrument
- opredelenija chuvstvitel'nosti bakterij k faktoram bioticheskoj i abioticheskoj prirody. Avtoref. diss. k. fiz.-mat. n. Saratov. 2015: 23. [in Russian]
24. *Pamp S.J., Sternberg C., Tolker-Nielsen T.* Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. Cytometry A 2009; 75: 2: 90—103.
 25. *Wright C.J., Shah M.K., Powell L.C., Armstrong I.* Application of AFM from microbial cell to biofilm. Scanning 2010; 32: 3: 134—149.
 26. *Гаврилова И.А., Жавнерко Г.К., Тумов Л.П.* Атомно-силовая микроскопия морфоструктурных изменений *Pseudomonas aeruginosa*, подвергшихся воздействию биоцида на основе алкилдиметилбензиламмония хлорида и полигексаметиленгуанидина. Доклады нац ак наук Беларуси 2013; 5: 81—87.
 27. *Шайхутдинова А.Р.* Механизмы модуляции работы рецепторно-канального комплекса хлоргексидином. Доклады академии наук 2005; 402: 427—429.
 28. *Hübner N.O., Kramer A.* Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. Skin Pharmacol Physiol 2010; 23: 17—27.
 29. *Smith K., Hunter I.S.* Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J Med Microbiol 2008; 57: 8: 966—973.
 30. *Bonez P.C., Dos Santos Alves C.F., Dalmolin T.V., Agertt V.A., Mizdal C.R., Flores Vda C. et al.* Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. Am J Infect Control 2013; 41: 12: 119—122.
 31. *Singh R., Ray P., Das A. et al.* Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1955—1958.
 32. *Barah F.* Non-antibiotic biocides: an updated review. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. (A. Méndez-Vilas, Ed.) Badajoz, Spain, Formatex Research Centre 2013; 598—607.
 33. *Chiang W.C., Pamp S.J., Nilsson M., Givskov M., Tolker-Nielsen T.* The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 65: 245—256.
 34. *Чеботарь И.В., Маянский Н.А., Кончакова Е.Д.* Новый метод исследования антибиотикорезистентности бактериальных биоплёнок. Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 14: 4: 303—308. / *Chebota' I.V., Majanskij N.A., Konchakova E.D.* Novyj metod issledovanija antibiotikorezistentnosti bakterial'nyh biopljonok. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2012; 14: 4: 303—308. [in Russian]
 35. *Sepandj F., Ceri H., Gibb A., Read R., Olson M.* Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. Perit Dial Int 2004; 24: 1: 65—67.
 36. *Shi L., Günther S., Hübschmann T., Wick L.Y., Harms H., Müller S.* Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. Cytometry A 2007; 71: 8: 592—598.
 37. *Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Евтеева Н.И., Руднева Е.И.* Межвидовое общение бактерий и образование смешанной (полимикробной) биоплёнки. Журн микробиол эпидемиол и иммунобиол 2012; 1: 93—101. / *Majanskij A.N., Chebota' I.V., Evteeva N.I., Rudneva E.I.* Mezvidovoe obshhenie bakterij i obrazovanie smeshanoj (polimikrobnnoj) biopljonki. Zhurn mikrobiol jepidemiol i immunobiol 2012; 1: 93—101. [in Russian]
 38. *Николаев Ю.А., Плакунов В.К.* Биоплёнка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма. Микробиол 2007; 76: 2: 149—163. / *Nikolaev Ju.A., Plakunov V.K.* Bioplenka — «gorod mikrobov» ili analog mnogokletochnogo organizma. Mikrobiol 2007; 76: 2: 149—163. [in Russian]
 39. *Mogilnaya O.A., Loboja T.I., Kargatova T.V., Popova L.Y.* Biofilm formation by bacterial associations under various salinities and cooper ion stress. Biofouling 2005; 21: 5: 6: 247—255.
 40. *Еньчева Ю.А., Колоколова А.А., Кузнецова М.В.* Действие антисептиков на биоплёнки клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в монокультуре и в ассоциации с *Staphylococcus aureus*. Российский иммунол журн 2015; 9: 18: 2: 1: 637—639. / *En'cheva Ju.A., Kolokolova A.A., Kuznecova M.V.* Dejstvie antiseptikov na bioplenki klinicheskikh shtammov *Pseudomonas aeruginosa* v monokul'ture i v associacii s *Staphylococcus aureus*. Rossijskij immunol zhurn 2015; 9: 18: 2: 1: 637—639. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Марина Валентиновна — д. м. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ. E-mail: mar@iegm.ru

Еньчева Юлия Абыталиновна — заочный аспирант кафедры общей хирургии №1 ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ, врач-хирург ожогового отделения ГАУЗ ПК «ГКБ №21»

Самарцев Владимир Аркадьевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии №1 ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ