

**ВЛИЯНИЕ НЕПЕРИОДИЧЕСКИХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК У *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

*Т.А. Каулей, 1 курс*

*Научный руководитель – Н.Н. Безручёнок, к.б.н., доцент  
Полесский государственный университет*

Актуальность изучения *Staphylococcus aureus* обусловлена тем, что на протяжении долгих лет сформировались новые штаммы, которые обладают широким спектром устойчивости к лекарственным препаратам, а также способны образовывать биопленки на биотических и абиотических поверхностях, что усложняет процесс борьбы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми *Staphylococcus aureus* [2, 4].

Биопленка – это сообщество микроорганизмов, прикрепленных к поверхности или друг к другу, позволяющая приобретать устойчивость к антимикробным агентам, стрессовым факторам, имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфических генов. Формирование биопленок является распространенным явлением и характерно для естественных и антропогенных условий обитания [1, 3].

Цель данной работы – определение степени влияния непериодических экологических факторов на образование биопленок у *Staphylococcus aureus*.

Основные задачи исследования:

1. Подобрать состав питательной среды для формирования биопленок у *Staphylococcus aureus*;
2. Исследовать влияние растительных алкалоидов на формирование биопленок *Staphylococcus aureus*;
3. Выявить влияние химических веществ на процесс образования биопленок у *Staphylococcus aureus*.

В данной работе была произведена визуальная оценка образования биопленок у двух штаммов *Staphylococcus aureus* и проанализировано воздействие на них непериодических экологических факторов.

**Материалы и методы исследований.** *Бактериальные штаммы.* В исследование включены два штамма стафилококков: лабораторный штамм *S.aureus* 1566 и лабораторный штамм *S.aureus* 1567, полученные из коллекции штаммов микробиологической лаборатории. Культивирование штаммов *S.aureus* проводили в Маннитно-солевом агаре (МСА) и среде Мюллера-Хинтона (МХ), при температуре 37 °С и времени экспозиции 8, 12, 24 и 48 ч.

Для оценки влияния непериодических экологических факторов на образование биопленок штаммами *S.aureus* использовали 96%-ный этанол, глюкозу кристаллическую растворенную, глюкозу в дисках, 1М раствор NaCl, растительные алкалоиды. Выбранные нами концентрации стрессовых факторов не вызвали значительного снижения роста или гибели планктонной культуры. Повторность опыта была трехкратной.

*Определение биопленкообразующей способности.* Для оценки интенсивности биопленкообразования использовали метод окрашивания биопленок. Метод был основан на окраске фиксированных в чашках Петри биопленок кристаллическим фиолетовым.

Формирование биопленки идентифицировали методом инкубации с кристаллическим фиолетовым (с модификациями). Резким встряхиванием удаляли жидкое содержимое чашек Петри и добавляли 125 мкл 0,1 %-ного раствора генциан фиолетового. Инкубировали биопленки с красителем в течение 20 минут при комнатной температуре. Для удаления красителя чашки промывали дистиллированной водой и оставляли для просушивания на фильтровальной бумаге. В качестве растворителя использовали 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Раствор с ДМСО

отбирали в объеме 125 мкл, помещали в чистые кюветы и измеряли оптическую плотность при длине волны 490 нм ( $OD_{490}$ ) на фотоколориметре КФК-2.

*Определение влияния химических веществ на образование биопленки.* Определение эффективности влияния химических веществ на биопленкообразование определяли путем окрашивания фиксированных в чашках Петри биопленок кристаллическим фиолетовым. Формирование биопленки идентифицировали методом инкубации с кристаллическим фиолетовым (с модификациями), согласно методу определения биопленкообразующей способности бактерий. Эффективность образования биопленки определяли путем сравнения оптической плотности штаммов *S. aureus*, на которые оказывалось влияние химических веществ, и штаммов *S. aureus*, которые не подвергались воздействию химических веществ.

*Электронная микроскопия.* Для определения интенсивности образования микробных биопленок *S. aureus* использовали суточные культуры, выращенные на агаре Мюллера-Хинтона. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов, после чего бульонную культуру осторожно удаляли и вносили в чашки Петри 1 мл 0,1 % водного раствора кристаллического фиолетового для окрашивания сформированных биопленок. Окрашивание проводили при комнатной температуре в течение 30 минут. Далее, полностью удалив из пробирок раствор кристаллического фиолетового, проводили экстракцию красителя из биопленки в 1 мл 96 % этанола в течение 1 часа при комнатной температуре. Удаляли остатки спирта и проводили изучение.

### Результаты исследований.

*Особенности формирования биопленок штаммами S. Aureus на различных питательных средах.*

Результаты определения биопленкообразования с помощью измерения оптической плотности показали, что образование биопленок происходит лучше на среде МХ (Мюллера-Хинтона) в сравнении со средой МСА. Причем наблюдается образование экзополисахаридного (ЭПС) матрикса после 48 ч культивирования. Также следует отметить, что образование биопленки штаммом *S. aureus* 1566 происходит значительно интенсивнее по сравнению со штаммом *S. aureus* 1567 на среде МХ, так как на среде МСА наблюдали очень слабо выраженную интенсивность образования биопленки (рисунок 1).

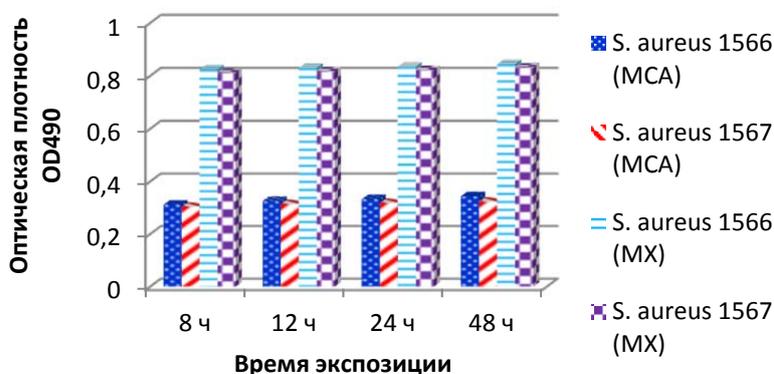
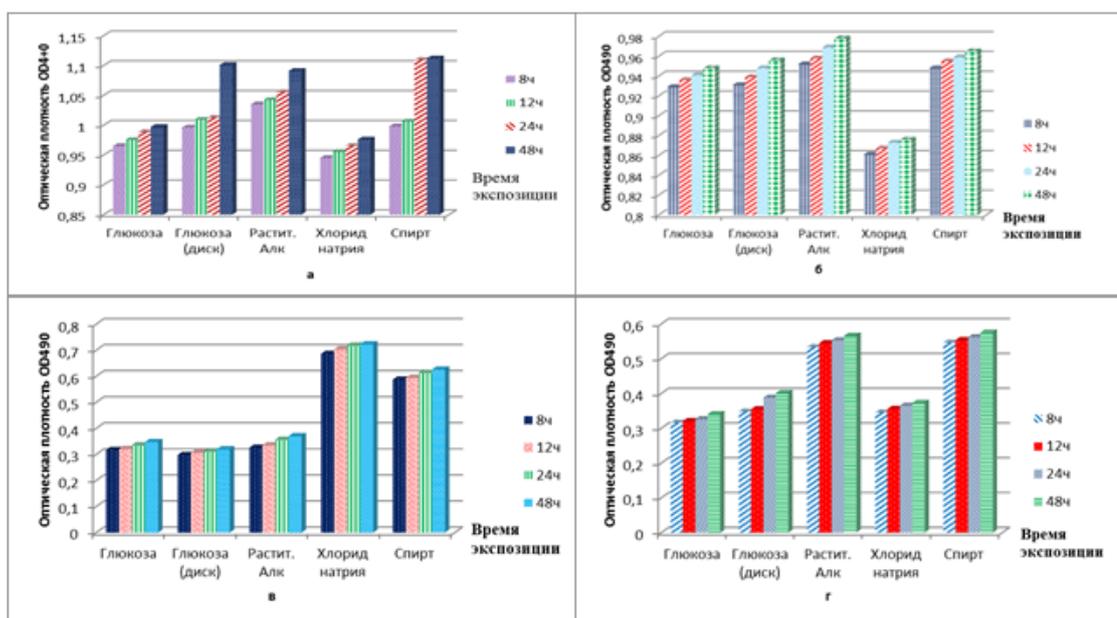


Рисунок 1. – Динамика образования биопленки лабораторным штаммом *S.aureus*1566и *S.aureus*1567 на средах МСА и МХ соответственно (контроль)

*Формирование биопленок при действии неперiodических экологических факторов.*



**Рисунок 2. – Динамика образования биопленки при действии непереродических экологических факторов (а, б – *S. aureus*1566 и *S. aureus*1567 на среде МХ соответственно; в, г – *S. aureus* 1566 и *S. aureus*1567 на среде МСА соответственно)**

Действие непереродических экологических факторов усиливает образование биопленки у двух штаммов культивируемых на среде МХ. На среде МСА наблюдали повышение интенсивности при добавлении в питательную среду хлорида натрия и спирта в случае штамма *S. aureus* 1566, а в варианте со штаммом *S. aureus* 1567 наблюдали интенсивное биопленкообразование при добавлении растительных алкалоидов и спирта (рисунок 2).

Таким образом, нами установлено, что уровень формирования биопленки выше при культивировании *S. aureus* на среде Мюллера-Хинтона. Увеличение образования биопленки происходит с увеличением времени экспозиции, особенно при добавлении в среду стресс-факторов, на которые оба штамма не отвечали, а наоборот увеличивали уровень образования биопленки. При культивировании *S. aureus* 1566 и *S. aureus* 1567 на Маннитно-солевом агаре был отмечен ответ на глюкозу и растительные алкалоиды – уровень образования биопленок снижался у штамма *S. aureus* 1566, у штамма *S. aureus* 1567 был отмечен ответ на хлорид натрия и на глюкозу. Остальные факторы вызывали интенсивность биопленкообразования одинаково у двух штаммов. Следовательно, биопленка устойчива к действию непереродических экологических факторов, в частности на среде Мюллера-Хинтона.

#### Список использованных источников

1. Camargo, G.M. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy / G.M. Camargo [et al.] // Int. J. Gynecol. Obstet. – 2005. – Vol. 90, No. 2. – P. 148–149.
2. Chen, L. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies / L. Chen, Y. M. Wen // Int. J. Oral. Sci. – 2011. – Vol. 3, No. 2. – P. 66–73.
3. Dongari-Bagtzoglou, A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress / A. Dongari-Bagtzoglou // Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. – 2008. – Vol. 6, No. 2. – P. 201–208.
4. Корниенко, М.А. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека / М.А. Корниенко [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – № 1. – С. 18–25.