

УДК 579.22

## ПОЛИСАХАРИД ГАЛАКТАН ПОДАВЛЯЕТ ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *Pseudomonas aeruginosa*, НО ЗАЩИЩАЕТ СФОРМИРОВАННЫЕ БИОПЛЕНКИ ОТ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ<sup>\*,\*\*</sup>

© 2019 А.В. Гришин<sup>1,2\*\*\*</sup>, А.С. Карягина<sup>1,2,3\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия;  
электронная почта: grishin-a1@yandex.ru, akaryagina@gmail.com

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
биотехнологии, 127550 Москва, Россия

<sup>3</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.10.2018

После доработки 21.01.2019

Принята к публикации 28.01.2019

Существуя в форме биопленок, микроорганизмы приобретают повышенную устойчивость к антибиотикам и другим неблагоприятным воздействиям. В связи с этим формирование биопленок патогенными бактериями представляет собой актуальную проблему здравоохранения. Одним из перспективных подходов для борьбы с бактериальными биопленками является использование полисахаридов, подавляющих их образование. Ранее нами была продемонстрирована способность полисахарида картофеля галактана ингибировать образование биопленок клиническим изолятом *Pseudomonas aeruginosa*. В данной работе более подробно исследовано действие галактана картофеля на биопленки, образуемые *P. aeruginosa*. Микроскопический анализ указывает на то, что галактан не препятствует адгезии бактериальных клеток к субстрату, но предотвращает дальнейшее накопление бактериальной биомассы. Кроме того, галактан способен не только ингибировать образование биопленок, но также может частично разрушать сформированные биопленки. Предположительно, действие галактана обусловлено излишней агрегацией бактериальных клеток, препятствующей формированию и поддержанию нормальной архитектуры биопленки, либо каким-то иным механизмом ремодуляции структуры биопленок, что приводит к неожиданному эффекту: после применения к сформированным биопленкам *P. aeruginosa* антибиотиков совместно с галактаном количество жизнеспособных бактерий в биопленках оказывается выше по сравнению с применением только антибиотиков. Галактан является первым полисахаридом, продемонстрировавшим подобный эффект в отношении бактериальных биопленок.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биопленки, галактан, *Pseudomonas aeruginosa*, полисахарид, антибиотики, устойчивость.

**DOI:** 10.1134/S0320972519050051

Биопленки представляют собой сложные сообщества микроорганизмов, погруженных в синтезированный ими внеклеточный матрикс, обычно прикрепленные к какой-либо поверхности [1]. Процесс формирования биопленки, как правило, характеризуется несколькими ста-

диями: первичным прикреплением клеток микроорганизмов к поверхности, их агрегацией и образованием микроколоний, ростом и созреванием биопленки и, наконец, дисперсией биопленки, способствующей дальнейшему распространению микроорганизмов [1]. Важной особен-

Принятые сокращения: МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МБК – минимальная бактерицидная концентрация; МКЭБ – минимальная концентрация эрадикации биопленки; CBD – Calgary biofilm device; PAO1 – *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM18-282, 25.03.2019.

\*\* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer ([Link.springer.com](http://link.springer.com)), том 84, вып. 5, 2019.

\*\*\* Адресат для корреспонденции.

ностью биопленок является повышенная устойчивость к воздействию антибиотиков, дезинфектантов и факторов иммунной системы [2–5]. Формирование биопленок патогенными бактериями в организме человека может приводить к развитию хронических инфекций, таких как эндокардит, хронические раневые инфекции, хронический отит, кариес и периодонтит, остеомиелит, инфекции мочевыводящих путей, хроническая пневмония у больных муковисцидозом. Кроме того, субстратом для образования биопленок (т.е. поверхностью, на которой они формируются) часто становятся различные имплантаты и катетеры [2, 3, 6]. В связи с этим интенсивно развивается направление исследований, связанное с поиском соединений, способных разрушать бактериальные биопленки или препятствовать их образованию.

Одним из перспективных классов подобных соединений являются полисахариды. В 2006 г. было впервые показано, что некоторые капсульные полисахариды *Escherichia coli* способны подавлять образование биопленок несколькими видами патогенных бактерий [7]. После этого подобные свойства были продемонстрированы и для других полисахаридов, преимущественно бактериального происхождения [8–21]. Способность подавлять образование биопленок была также обнаружена у растительных полисахаридов галактана и галактоманнана [22] и полисахаридов, продуцируемых дрожжами [23] и диатомовыми водорослями [24]. Полисахариды обладают такими преимуществами, как потенциально низкая стоимость, биodeградируемость и биосовместимость [25, 26], и дальнейшее исследование полисахаридов, оказывающих влияние на образование или разрушение биопленок, является важной задачей.

Характер воздействия различных полисахаридов на биопленки неодинаков. Некоторые из них, такие как РАМ галактан, выделенный из культуры *Kingella kingae*, или полисахарид, продуцируемый *Pseudoalteromonas haloplanktis*, а также экзополисахарид EPS273 *Pseudomonas stutzeri*, способны частично или полностью разрушать сформированные бактериальные биопленки [12, 14, 20]. Другие полисахариды подавляют образование новых биопленок, но не оказывают влияние на уже сформированные биопленки [7, 19, 21]. По-видимому, механизм действия полисахаридов чаще всего связан с предотвращением первоначальной адгезии бактериальных клеток к субстрату [10, 14, 19–21]. В ряде случаев полисахариды также препятствовали агрегации бактериальных клеток друг с другом [7, 8, 27, 28]. Как правило, авторы объясняют это изменением физико-химических характеристик поверхнос-

ти бактериальных клеток и/или субстрата за счет взаимодействия с полисахаридами.

Наиболее вероятным способом применения соединений, воздействующих на бактериальные биопленки, является их использование в качестве дополнения к традиционной антибиотикотерапии. Тем не менее только в одной работе описывается совместное применение антибиотиков и полисахарида, разрушающего биопленки. Экзополисахарид A101, выделенный из культуры *Vibrio* spp. QY101, повышал эффективность действия нескольких аминогликозидных антибиотиков в отношении биопленок *P. aeruginosa* в 32 раза [8].

Ранее нами было показано, что полисахарид картофеля галактан подавляет образование биопленок клиническим изолятом *P. aeruginosa* 216 при культивировании в течение 5 ч [22]. Целью данной работы являлось более подробное исследование влияния галактана картофеля на биопленки *P. aeruginosa*, в т.ч. совместного действия галактана и традиционных антибиотиков, применяемых при инфекциях, вызванных *P. aeruginosa*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы и среды.** В работе использовали лабораторный штамм *P. aeruginosa* PAO1 и клинический изолят *P. aeruginosa* 216, ранее выделенный от больного муковисцидозом сотрудниками лаборатории проф. И.А. Шагиняна (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Штаммы хранили в 40%-ном глицерине при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Во время работы штаммы поддерживали пересевом на агаризованной (1,5% агара) питательной среде Difco Nutrient Broth («Becton Dickinson», США). Для подсчета КОЕ и определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) использовали агаризованную среду Difco Nutrient Broth с добавлением 1% NaCl, для культивирования биопленок и других экспериментов – среду M63 (3 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 7 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и 2 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) с добавлением 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 0,5% казаминовых кислот и 0,2% глюкозы [29], если не указано иначе.

**Культивирование, ингибирование и разрушение биопленок.** Полисахариды галактан картофеля (P-GALPOT) и глюкан ячменя (P-BGBL) были приобретены в компании «Megazyme» (Ирландия). Полисахариды растворяли в стерильной воде в концентрации 10 мг/мл. Для этого к навеске галактана добавляли часть объема воды и непрерывно перемешивали суспензию при температуре  $\sim 60^{\circ}\text{C}$  до полного растворения полисахарида. Аналогичным образом к навеске глюкана добавляли часть объема воды и доводили суспензию до кипения при непрерывном пе-

ремешивании, после чего нагрев отключали и продолжали перемешивать до полного растворения полисахарида. После остывания растворы доводили водой до финального объема и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 g для того, чтобы осадить все нерастворившиеся примеси, после чего супернатант отбирали и инкубировали в течение 2 ч при 80 °С. Стерильность растворов полисахаридов подтверждали высевом на агаризованные среды Difco Nutrient Broth («Becton Dickinson», США) и ВНИ («Sifin Diagnostics», Германия), а также инокуляцией в жидкую тиогликолевую среду («HiMedia Laboratories», Индия).

В данной работе биопленки *P. aeruginosa* культивировали либо на стенках лунок 96-луночных планшетов, либо на полипропиленовых купонах. Для культивирования биопленок на стенках лунок 96-луночных планшетов *P. aeruginosa* PAO1 или изолят *P. aeruginosa* 216 выращивали на агаризованной среде Difco Nutrient Broth в течение 20–24 ч, культуру бактерий суспендировали в жидкой среде М63 с добавлением магния, казаминовых кислот и глюкозы до оптической плотности, соответствующей стандарту 0,5 по МакФарланду, и разводили до итоговой концентрации  $\sim 3\text{--}5 \times 10^7$  КОЕ/мл. Получившуюся бактериальную суспензию вносили в лунки 96-лучного планшета (Costar 3599 tissue culture treated flat bottom plates, «Corning», США) в объеме 90 мкл, после чего в лунки добавляли по 10 мкл раствора полисахарида, моносахарида или воды (контроль). Планшет запечатывали парафильмом и инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. После инокуляции биопленки аккуратно отмывали следующим образом. К содержимому лунок планшета добавляли по 100 мкл среды М63, содержимое лунок пипетировали и отбирали с помощью многоканальной пипетки. Затем в лунки вносили по 200 мкл М63, и содержимое планшета вытряхивали в автоклавируемый контейнер. Последнюю процедуру повторяли 3 раза. Остатки жидкости вытряхивали за счет отстукивания планшета о бумажную салфетку, и планшет оставляли сушиться в перевернутом положении в течение суток. Для окрашивания биопленок лунки планшета заполняли 200 мкл 0,1%-ного раствора кристаллвиолета, планшет инкубировали в течение 20–30 мин, промывали водой и высушивали в перевернутом положении. Для растворения связавшегося с биопленками красителя в лунки планшета вносили по 100 мкл 30%-ной уксусной кислоты, после чего планшет инкубировали в течение 20–30 мин. Содержимое лунок перемешивали с помощью пипетирования, и по 90 мкл из каждой лунки переносили в новый 96-луночный планшет для

измерения оптической плотности. Поглощение измеряли при длине волны 550 нм на планшетном ридере Multiscan FC («Thermo Fischer Scientific», США). Для экспериментов с разрушением сформированных биопленок биопленки *P. aeruginosa* культивировали в 96-луночных планшетах в течение 24 ч и отмывали. В лунки планшета, содержавшие биопленки, вносили по 90 мкл свежей среды М63 с добавлением магния, казаминовых кислот и глюкозы, а также по 10 мкл раствора полисахарида или воды (контроль). Лунки с контрольными 24-часовыми биопленками оставляли пустыми. Планшет запечатывали парафильмом и инкубировали при 36 °С в течение 24 ч, после чего биопленки отмывали, окрашивали и измеряли оптическую плотность, как описано выше.

Для культивации биопленок *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах из листа полипропилена толщиной 0,5 мм (Trans G03, «Carolex», Франция) вырезали купоны размером  $\sim 10,0 \times 6,5$  мм, стерилизовали 70%-ным этанолом и высушивали в стерильных условиях. Купоны помещали вертикально в лунки 96-лучного планшета, содержавшие 100 мкл суспензии бактерий в среде М63 с магнием, казаминовыми кислотами и глюкозой, с добавлением или без добавления галактана. Планшет запечатывали парафильмом и инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. После инокуляции купоны вынимали из планшета с помощью пинцета, аккуратно промывали средой М63, высушивали, окрашивали в течение 20–30 мин 0,1%-ным кристаллвиолетом, отмывали водой и снова высушивали. Для экспериментов с разрушением сформированных биопленок биопленки культивировали на полипропиленовых купонах в течение 24 ч, отмывали стерильной средой М63 и снова помещали в лунки 96-лучного планшета, содержавшие 100 мкл свежей среды с добавлением или без добавления галактана. Планшет запечатывали парафильмом и инкубировали в течение 24 ч, после чего купоны извлекали, промывали и окрашивали. Поскольку биопленка формируется на обеих сторонах полипропиленовых купонов, перед фотографированием и микроскопией со стороны, обращенной вниз при высушивании купона, биопленку стирали 70%-ным этанолом.

Подсчет количества жизнеспособных бактерий проводили в биопленках, культивированных на полипропиленовых купонах. Купоны с биопленками помещали в 1,5-мл микроцентрифужные пробирки, содержавшие  $\sim 500$  мкл стеклянных шариков диаметром 0,6–0,8 мм и 400 мкл среды М63 (в случае PAO1) или PBS (в случае изолята 216), после чего подвергали интенсивному перемешиванию в течение 15 с (3500 об/мин,

Microspin FV-2400; «Biosan», Латвия). Количество жизнеспособных бактерий, снятых таким образом с полипропиленовых купонов, определяли путем высева на агаризованную питательную среду и подсчета КОЕ. Необходимо отметить, что применение подобной процедуры к планктонным клеткам приводило к снижению количества КОЕ на ~40–50% для PAO1 и ~10% для изолята 216. Однако это снижение было существенно меньшим, чем разница в количестве жизнеспособных клеток между разными вариантами биопленок, в особенности после обработки антибиотиками.

**Определение МИК, МБК и МКЭБ.** Растворы цефтазидима и амикацина сульфата (ОАО «Синтез», Россия) из сухих навесок, а также рабочие растворы ципрофлоксацина («Elfa Laboratories», Индия) из стокового раствора (2 мг/мл) готовили заново перед каждым экспериментом.

Бактерии выращивали на агаризованной среде Difco Nutrient Broth в течение 20–24 ч, культуру бактерий суспендировали в жидкой среде М63 с добавлением магния, казаминовых кислот и глюкозы до оптической плотности, соответствующей стандарту 0,5 по МакФарланду, и разводили до итоговой концентрации  $\sim 5 \times 10^5$  или  $\sim 5 \times 10^7$  КОЕ/мл (см. раздел «Результаты исследования»). Получившуюся бактериальную суспензию вносили в лунки 96-лучного планшета в объеме 90 мкл, после чего в лунки добавляли по 10 мкл серийных двукратных разведений антибиотиков в той же среде. Планшет запечатывали парафильмом и инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как наименьшую концентрацию антибиотика, приводящую к отсутствию видимой мутности в лунках планшета. После определения МИК на чашки Петри с агаризованной питательной средой переносили по 3 мкл содержимого лунок планшета, чашки инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. МБК определяли как наименьшую концентрацию антибиотика, приводящую к отсутствию бактериального роста на агаризованной питательной среде. Такая методика определения МБК несколько отличается от стандартной и основана на методике, описанной Т.-Ф. Мах [30].

Для определения минимальных концентраций эрадикации биопленок (МКЭБ, МВЕС, Minimal Biofilm Eradicating Concentration) использовали Calgary Biofilm Device (CBD, МВЕС Biofilm Inoculator; «Innovotech», Канада). CBD представляет собой крышку для 96-лучного планшета, снабженную колышками, которые погружаются в лунки планшета при закрытии крышки. При использовании CBD биопленки образуются на поверхности колышков. Для

культивирования биопленок CBD помещали на планшет, содержащий по 150 мкл суспензии бактерий в концентрации  $\sim 3\text{--}5 \times 10^7$  КОЕ/мл, и инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. После этого биопленки дважды промывали с помощью переноса CBD на новый планшет, содержащий по 200 мкл стерильной среды М63, и инкубировали с качанием (250 об/мин) в течение 1 мин. Затем CBD переносили на планшет, содержащий по 200 мкл серийных двукратных разведений антибиотиков в среде М63 с магнием, казаминовыми кислотами и глюкозой, а также с добавлением или без добавления галактана, и инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. После обработки антибиотиками биопленки снова дважды промывали, CBD переносили на планшет, содержащий по 200 мкл среды Difco Nutrient Broth, и инкубировали в течение 24 ч для того, чтобы дать возможность возобновить бактериальный рост биопленкам, сохранившим жизнеспособные бактерии. Возобновление роста выявляли по наличию видимой мутности в лунках планшета, а также с помощью посева содержимого лунок на агаризованную питательную среду. МКЭБ определяли как минимальную концентрацию антибиотика, после обработки которой биопленка не может возобновить бактериальный рост.

**Подсчет количества жизнеспособных бактерий в биопленках после обработки антибиотиками.** Количество бактерий, сохраняющих жизнеспособность после обработки антибиотиками, определяли в биопленках, культивированных на полипропиленовых купонах. Биопленки культивировали на купонах в течение 24 ч, после чего промывали и помещали в 1,5-мл микроцентрифужные пробирки, содержавшие 700 мкл раствора антибиотика в среде М63 с магнием, казаминовыми кислотами и глюкозой, с добавлением или без добавления галактана. Пробирки инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. После этого количество жизнеспособных бактерий в биопленках определяли по методике, описанной выше. Поскольку для подсчета колоний на агаризованную среду переносили по 10 мкл суспензии бактерий, теоретический предел обнаружения соответствует  $\sim 100$  КОЕ/мл или 40 КОЕ/купон ( $1,6 \log_{10}$  КОЕ/купон). Для того чтобы определить, остаются ли в биопленке жизнеспособные бактерии в количестве ниже предела обнаружения, в пробирки, в которых проводили снятие биопленок с купонов, добавляли по 400 мкл среды Difco Nutrient Broth, пробирки инкубировали при 36 °С в течение 24 ч. Бактериальный рост определяли по наличию мутности, а также с помощью посева на агаризованную питательную среду.

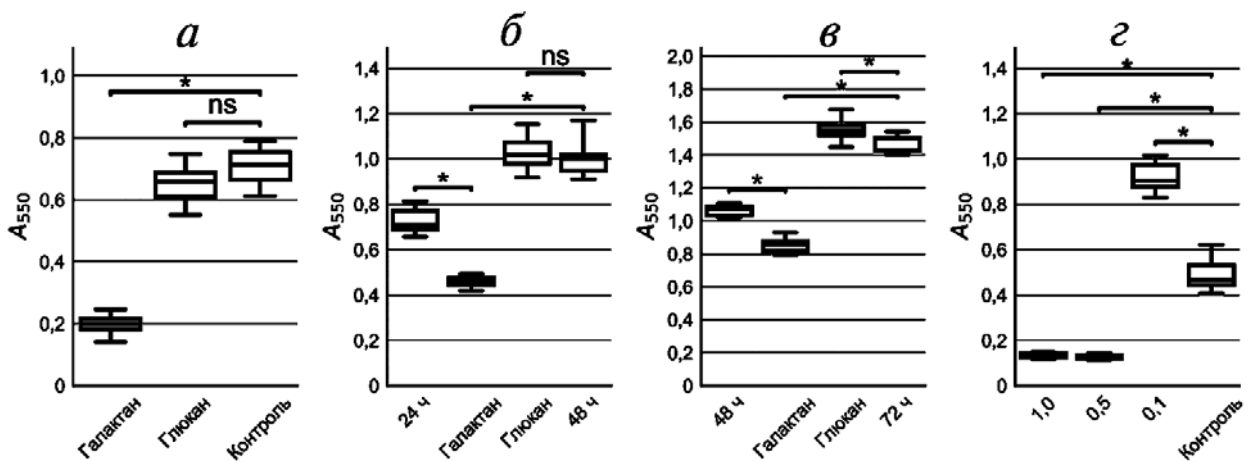
**Флуоресцентная микроскопия.** Биоупленки PAO1 культивировали на полипропиленовых купонах и обрабатывали амикацином (256 мкг/мл) с добавлением или без добавления 1 мг/мл галактана. После обработки биоупленки промывали водой и окрашивали красителями FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit («Molecular Probes», США) в течение 15 мин в соответствии с рекомендациями производителя. Окрашенные биоупленки визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS FLoid Cell Imaging Station («Thermo Fischer Scientific», США). Для повышения контрастности изображения обрабатывали с использованием программы Fiji [31]. Сначала использовали функцию «subtract background» с опцией «create background» для подсчета средних значений интенсивности фона для красного и зеленого каналов по отдельности. Затем нормировали интенсивность красного и зеленого каналов всех изображений таким образом, чтобы интенсивность фона во всех случаях была одинаковой. После этого использовали функцию «subtract background» для удаления фона и совмещали красный и зеленый каналы для получения итогового изображения.

**Статистический анализ.** Статистический анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel с помощью дополнения Real Statistics Resource Pack Excel add-on (Release 4.7, Charles Zaiontz, www.real-statistics.com). Принадлежность

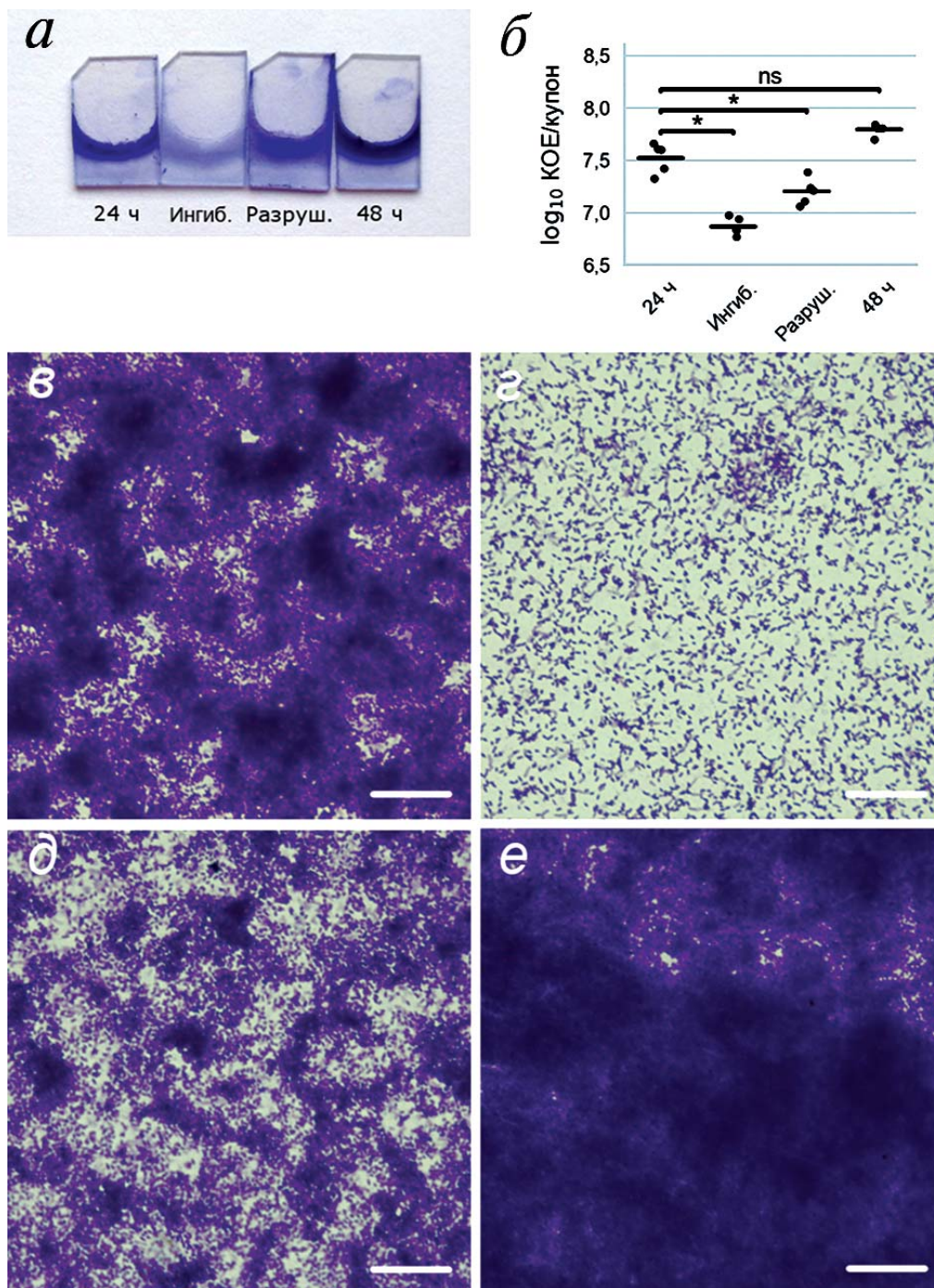
данных к нормальному распределению оценивали тестом Шапиро–Уилка. Для определения статистической значимости различий между вариантами использовали двусторонний *t*-критерий Стьюдента для неравных дисперсий либо двусторонний критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  с учетом поправки Данна–Шидака на множественные сравнения. В экспериментах с подсчетом КОЕ все статистические параметры и критерии вычисляли после логарифмического преобразования данных. На всех рисунках, кроме рис. 3, представлены результаты одного эксперимента, однако все эксперименты, за исключением разрушения 48-часовых биоупленок (рис. 1, в), были выполнены как минимум дважды. На рис. 3 для увеличения количества повторностей и мощности статистического анализа совмещены результаты двух независимых экспериментов. Данные экспериментов представлены в Приложении.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Галактан картофеля ингибирует образование биоупленок и частично разрушает сформированные биоупленки.** Ранее нами было показано, что галактан картофеля способен ингибировать начальную стадию образования биоупленок клиническим изолятом *P. aeruginosa* 216 [22]. Для дальнейшего исследования галактана был выбран



**Рис. 1.** Влияние галактана на образование и разрушение биоупленок *P. aeruginosa* PAO1 в 96-луночных планшетах. а – образование биоупленок PAO1 в присутствии 1 мг/мл галактана картофеля (Галактан), 1 мг/мл глюкозы ячменя (Глюкан) или без полисахаридов (Контроль) в течение 24 ч; б – разрушение биоупленок PAO1, предварительно культивированных в течение 24 ч (24 ч), под воздействием 1 мг/мл галактана картофеля (Галактан), 1 мг/мл глюкозы ячменя (Глюкан) или без полисахарида (48 ч); в – разрушение биоупленок PAO1, предварительно культивированных в течение 48 ч (48 ч), под воздействием 1 мг/мл галактана картофеля (Галактан), 1 мг/мл глюкозы ячменя (Глюкан) или без полисахарида (72 ч); г – образование биоупленок PAO1 в присутствии 1,0; 0,5 и 0,1 мг/мл галактана картофеля или без него (Контроль) в течение 24 ч. Данные представлены в виде диаграммы типа «ящик с усами», где границы «ящика» обозначают 25-й и 75-й процентиля, линия в середине – медианное значение, «усы» – минимальное и максимальное значения. Статистическую значимость отличий между группами определяли с помощью двустороннего критерия Стьюдента (*t*-тест) с неравными дисперсиями. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$  с учетом поправки на множественные сравнения



**Рис. 2.** Влияние галактана на образование и разрушение биопленок *P. aeruginosa* PAO1 на полипропиленовых купонах. *а* – Фотографии полипропиленовых купонов с биопленками, окрашенными кристаллвиолетом: контрольной биопленкой, культивированной в течение 24 ч (24 ч); биопленкой, культивированной в течение 24 ч в присутствии 1 мг/мл галактана картофеля (Ингиб.); 24-часовой биопленкой, дополнительно обработанной в течение 24 ч 1 мг/мл галактана картофеля (Разруш.); контрольной 48-часовой биопленкой (48 ч); *б* – количество жизнеспособных бактерий в биопленках, культивированных на полипропиленовых купонах (обозначения как на фрагменте *а*). Данные представлены отдельными точками ( $n = 5$ ), средние значения показаны горизонтальными линиями. Статистическую значимость отличий между группами определяли с помощью двустороннего критерия Стьюдента ( $t$ -тест) с неравными дисперсиями. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$  с учетом поправки на множественные сравнения; *в–е* – микрофотографии биопленок, культивированных на полипропиленовых купонах: *в* – контрольная 24-часовая биопленка; *г* – биопленка, культивированная в присутствии 1 мг/мл галактана картофеля; *д* – 24-часовая биопленка, дополнительно обработанная 1 мг/мл галактана картофеля; *е* – контрольная 48-часовая биопленка. Длина масштабного отрезка – 25 мкм.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

лабораторный штамм *P. aeruginosa* PAO1, широко используемый при изучении биопленок *P. aeruginosa*.

Галактан картофеля в концентрации 1 мг/мл практически полностью подавлял образование биопленок PAO1 при культивировании в течение 24 ч: количество биомассы в биопленках, культивированных в присутствии галактана, было в 3,5 раза меньше, чем в контроле (рис. 1, а). Глюкан ячменя, взятый в качестве контрольного полисахарида, не оказывал значимого влияния на формирование биопленок (рис. 1, а). Было отмечено, что галактан вызывает сильную агрегацию бактериальных клеток: при отмывании биопленок, культивированных в присутствии

галактана, слизистые агрегаты в планктонной фракции были заметны невооруженным глазом. Подобные агрегаты не были обнаружены в контрольных лунках или лунках, содержащих глюкан.

При обработке галактаном картофеля в концентрации 1 мг/мл биопленок, предварительно культивированных в течение 24 ч, наблюдалось их частичное разрушение: количество биомассы в них снижалось почти на 40% (рис. 1, б). Контрольный полисахарид глюкан ячменя не оказывал влияния на сформированные биопленки PAO1 (рис. 1, б). Похожая картина наблюдалась при обработке галактаном биопленок, предварительно культивированных в течение 48 ч (рис. 1, в).

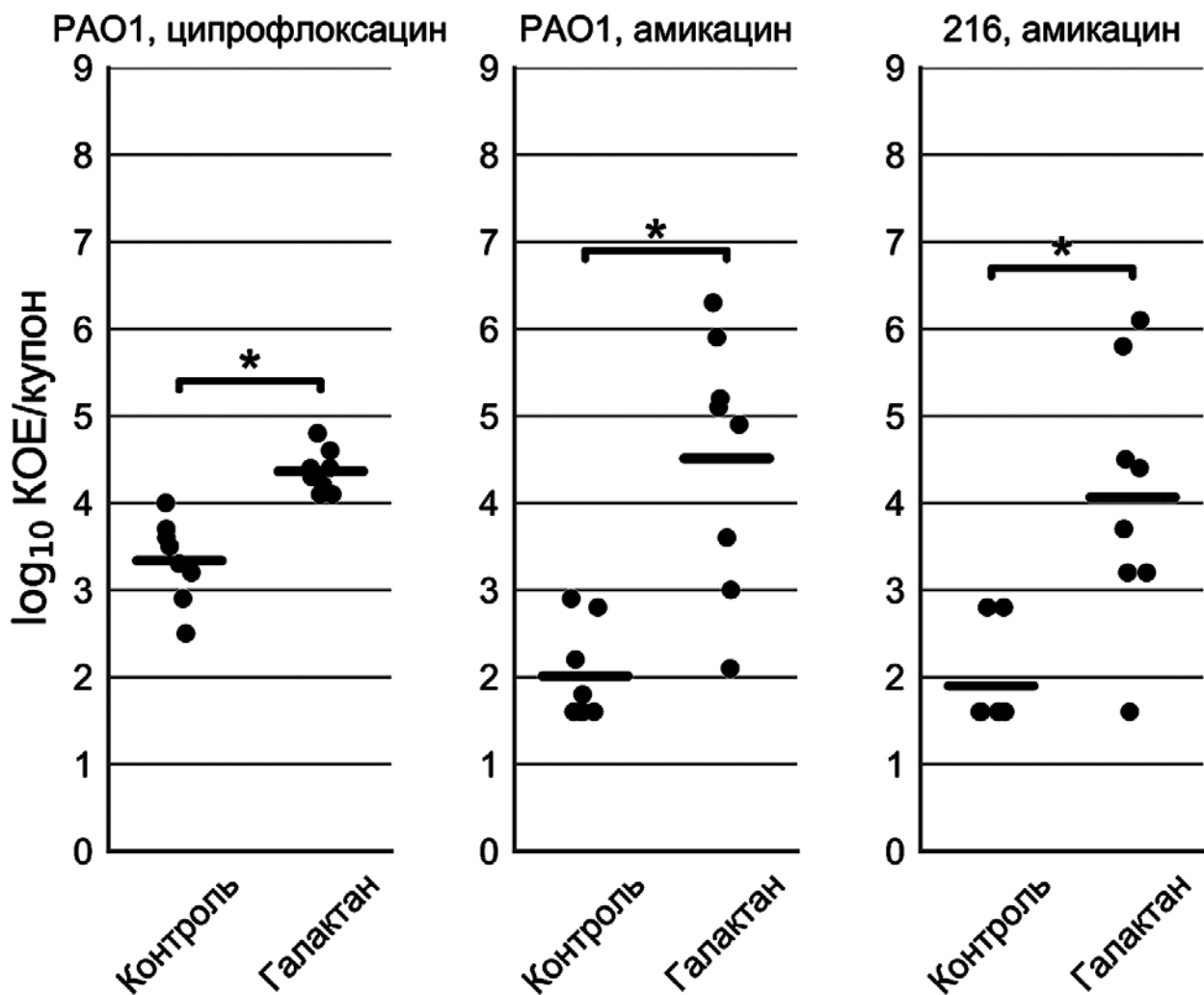


Рис. 3. Количество жизнеспособных бактерий в биопленках *P. aeruginosa* PAO1 и 216 после обработки антибиотиками (Контроль) или антибиотиками совместно с галактаном картофеля (Галактан). Данные представлены отдельными точками ( $n = 8$ ), средние значения показаны горизонтальными линиями. Значения ниже порога определения были приравнены к  $1,6 \log_{10}$  КОЕ/купон, поскольку, несмотря на отсутствие колоний при высеве на агаризованную среду, при добавлении жидкой питательной среды к разрушенным биопленкам они давали бактериальный рост. Статистическую значимость отличий между группами определяли с помощью двустороннего критерия Манна–Уитни. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$  с учетом поправки на множественные сравнения

Для исследования влияния концентрации галактана картофеля на оказываемый им эффект, биопленки PAO1 культивировали в присутствии 0,5 и 0,1 мг/мл галактана. Интересно, что, хотя концентрация 0,5 мг/мл оказывала действие, аналогичное исходно взятой концентрации 1 мг/мл, в 10 раз меньшая концентрация галактана 0,1 мг/мл не только не подавляла образование биопленок PAO1, но наоборот, приводила к статистически значимому увеличению их биомассы (рис. 1, з). В дальнейшем для всех опытов была использована концентрация 1 мг/мл.

Полимерная структура галактана оказалась необходимой для его активности, поскольку мономерная галактоза, взятая в той же концентрации, не оказывала никакого действия на формирование биопленок PAO1 (данные не приведены).

Далее влияние галактана картофеля на биопленки *P. aeruginosa* было исследовано с помощью микроскопии. Для этого биопленки культивировали на полипропиленовых купонах, помещенных в лунки 96-луночных планшетов в вертикальной ориентации, высушивали и окрашивали кристаллвиолетом. Характер воздействия галактана на биопленки PAO1 на полипропиленовых купонах визуально соответствовал результатам, полученным в 96-луночных планшетах. В частности, рост биопленок в присутствии галактана был практически полностью подавлен, а обработка галактаном сформированных биопленок приводила к их частичному разрушению (рис. 2, а, б). При микроскопическом анализе контрольная биопленка, культивированная в течение 24 ч без галактана, представляла собой крупные плотные агрегаты бактериальных клеток, перемежающиеся менее плотными скоплениями или даже участками полипропилена, свободными от бактерий (рис. 2, в). Биопленка, культивированная в присутствии галактана, значительно отличалась от контрольной и была представлена равномерно распределенными по поверхности субстрата бактериальными клетками, не образующими выраженных скоплений (рис. 2, г). Биопленка, сформированная в отсутствие галактана, а затем обработанная галактаном, была схожа с контрольной, но более «разрежена»: агрегаты бактерий были меньшего размера и занимали меньшую площадь (рис. 2, д). Наконец, контрольная биопленка, культивированная в течение 48 ч без галактана, представляла собой чрезвычайно плотный мат, состоящий из бактериальной биомассы, морфологические черты которой было трудно различить с помощью световой микроскопии (рис. 2, е).

Количество жизнеспособных бактерий в биопленках, культивированных на полипропилено-

вых купонах, хорошо соответствовало результатам измерения количества биомассы в 96-луночных планшетах. Биопленка, культивированная в присутствии галактана, содержала в ~4,5 раза меньше жизнеспособных бактерий по сравнению с контролем. Аналогичным образом биопленка, обработанная галактаном после предварительного культивирования в течение 24 ч, содержала в 2 раза меньшее количество жизнеспособных бактерий, чем биопленка до обработки (рис. 2, б).

**Галактан картофеля защищает бактерии внутри биопленки от антибиотиков.** Наиболее вероятный сценарий применения соединений, воздействующих на бактериальные биопленки, предполагает их использование в качестве дополнения к стандартной антибактериальной терапии. Поэтому далее было изучено совместное действие антибиотиков и галактана на биопленки *P. aeruginosa*. В рамках данной работы было выбрано три антибиотика, относящихся к разным классам и используемых в клинической практике для лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*: цефалоспориновый антибиотик цефтазидим, фторхинолон ципрофлоксацин и аминогликозид амикацин.

Определенные нами МИК и МБК этих антибиотиков в отношении PAO1 представлены в таблице. Известно, что некоторые антибиотики могут проявлять так называемый «эффект инокулюма», заключающийся в том, что при более высокой концентрации бактерий в исходной суспензии по сравнению со стандартной ( $5 \times 10^5$  КОЕ/мл) МИК такого антибиотика существенно возрастает. Поскольку количество бактерий в биопленке существенно выше, чем  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл (рис. 2, б), наблюдаемая устойчивость биопленки к антибиотику может быть связана именно с «эффектом инокулюма», а не со специфическими механизмами устойчивости, присущими биопленкам. В связи с этим МИК всех антибиотиков были определены не только для стандартной концентрации бактерий, но также для концентрации  $5 \times 10^7$  КОЕ/мл (таблица). В случае цефтазидима наблюдался выраженный «эффект инокулюма», т.е. МИК этого антибиотика при стандартной исходной концентрации бактерий составляла 2 мкг/мл, а при повышенной — более 16 мкг/мл. В связи с этим цефтазидим был исключен из исследования. Два других антибиотика не показали выраженной зависимости МИК от исходной концентрации бактерий. Необходимо отметить, что МИК амикацина оказалась достаточно высокой — 32 мкг/мл, что связано с использованием среды М63, поскольку тестирование дисковым методом на стандартном агаре Мюллер–Хинтон выявило чувствительность PAO1 к амикацину.



Значения МИК, МБК и МКЭБ антибиотиков в отношении *P. aeruginosa* PAO1 и изолята *P. aeruginosa* 216

Штамм	Исходная концентрация бактерий, КОЕ/мл	МИК, мкг/мл			МБК, мкг/мл		МКЭБ, мкг/мл	
		ципрофлоксацин	амикацин	цефтазидим	ципрофлоксацин	амикацин	ципрофлоксацин	амикацин
PAO1	$5 \times 10^5$	0,125	32	2	0,25	64	–	–
	$5 \times 10^7$	0,125	64	>16	0,25	256	>32	256
216	$5 \times 10^5$	–	32	–	–	64	–	–
	$5 \times 10^7$	–	64	–	–	256	–	512

Для определения МКЭБ биопленки вначале культивировали на колышках CVD, после чего инкубировали в растворе антибиотиков. Затем биопленки помещали в свежую питательную среду для возобновления роста бактерий, сохранивших жизнеспособность после обработки антибиотиками. Минимальная концентрация амикацина, после обработки которой биопленка PAO1 не способна возобновить рост, оказалась равной 256 мкг/мл. МКЭБ ципрофлоксацина превысила максимальную из протестированных концентраций – 32 мкг/мл, которая в 256 раз превышает МИК, и, таким образом, не была определена (таблица).

Несмотря на то, что галактан картофеля частично разрушал биопленку PAO1, добавление 1 мг/мл галактана одновременно с антибиотиками не изменило МКЭБ ни одного из антибиотиков.

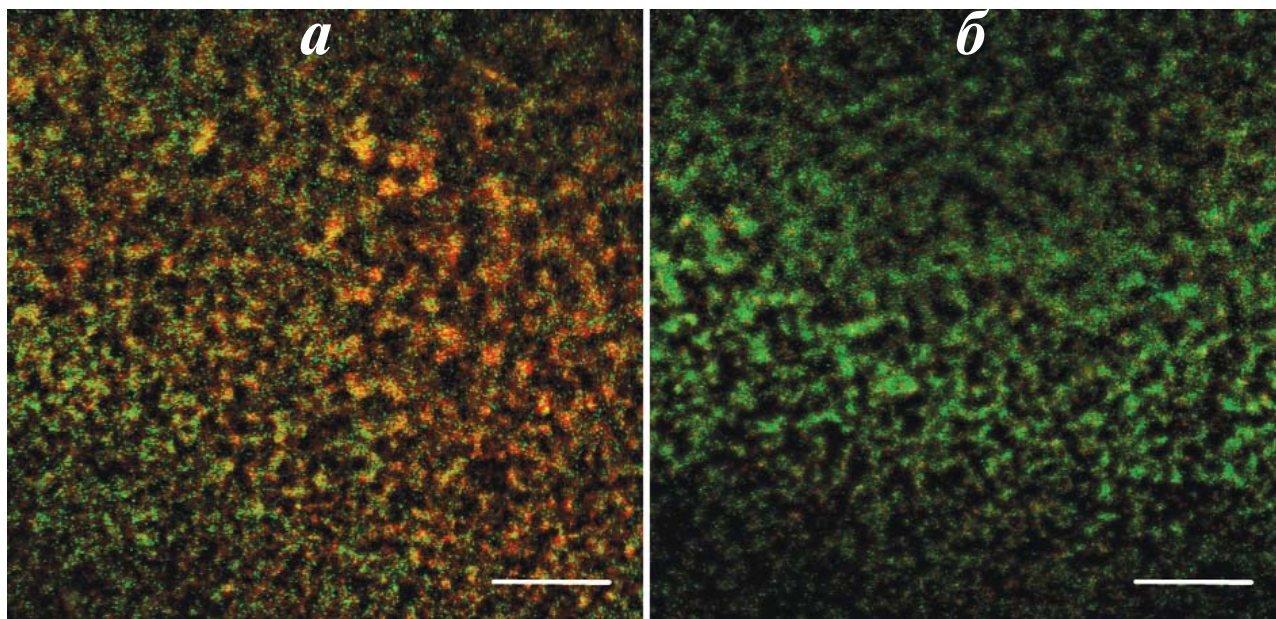
Далее мы предположили, что, хотя добавление галактана не влияет на МКЭБ антибиотиков, возможно, галактан позволяет снизить количество жизнеспособных бактерий в биопленке по сравнению с применением только антибиотиков. Чтобы проверить это предположение, биопленки культивировали на полипропиленовых купонах, после чего инкубировали в растворе ципрофлоксацина (1 мкг/мл) или амикацина (256 мкг/мл) с добавлением или без добавления 1 мг/мл галактана картофеля. Результаты определения количества жизнеспособных бактерий в обработанных таким образом биопленках представлены на рис. 3.

Вопреки ожиданиям, добавление галактана не только не уменьшило количество жизнеспособных бактерий в обработанных антибиотиками биопленках, но наоборот, значительно увеличило его. Так, количество жизнеспособных бактерий в биопленках, обработанных 1 мкг/мл ципрофлоксацина, в среднем составляло  $2,2 \times 10^3$  КОЕ/купон, а в случае применения антибиотика в сочетании с галактаном –  $2,3 \times 10^4$  КОЕ/купон. Для амикацина эта разница оказалась еще более заметной. Если после обработки биопленок ами-

кацином количество жизнеспособных бактерий зачастую оказывалось ниже порога детекции (~40 КОЕ/купон), то при добавлении галактана это количество возрастало вплоть до  $2,0 \times 10^6$  КОЕ/купон при среднем значении  $3,2 \times 10^4$  КОЕ/купон.

Наблюдаемый эффект может быть объяснен двумя способами. С одной стороны, галактан может способствовать повышению устойчивости бактерий к антибиотикам. С другой стороны, возможно, часть бактерий не погибает под воздействием антибиотика, а переходит в некультивируемое состояние, и галактан препятствует такому переходу, что приводит к кажущемуся увеличению количества жизнеспособных бактерий при высеве на агаризованную питательную среду. Для того чтобы понять, какое из этих объяснений более вероятно, биопленки PAO1, обработанные амикацином или амикацином в сочетании с галактаном, были исследованы с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 4). Для различения жизнеспособных и мертвых бактерий биопленки окрашивали красителями LIVE/DEAD. При использовании этих красителей живые бактерии окрашиваются зеленым, мертвые бактерии и внеклеточная ДНК – красным. Как видно на рис. 4, после обработки амикацином в сочетании с галактаном картофеля в биопленке остается существенно больше жизнеспособных клеток по сравнению с биопленкой, обработанной только амикацином. Таким образом, галактан, по-видимому, каким-то образом защищает биопленки PAO1 от действия антибиотиков. Интересно, что при инкубации планктонных клеток с антибиотиками и галактаном в тех же концентрациях подобного защитного эффекта не наблюдалось.

Далее мы решили проверить, оказывает ли галактан подобное воздействие на другие штаммы *P. aeruginosa*, а именно на клинический изолят *P. aeruginosa* 216, использованный в предыдущей работе [22]. Для тестирования совместного действия с галактаном на изолят 216 был выбран амикацин, поскольку он проявлял наиболее



**Рис. 4.** Биопленки *P. aeruginosa* PAO1, обработанные амикацином (а) или амикацином совместно с галактаном картофеля (б) и окрашенные флуоресцентными красителями LIVE/DEAD. Длина масштабного отрезка – 100 мкм. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

выраженный эффект в случае PAO1. МИК и МБК амикацина в отношении изолята 216 оказались такими же, как и для PAO1, т.е. 32 и 64 мкг/мл при исходной концентрации бактерий  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл и 64 и 256 мкг/мл при исходной концентрации бактерий  $5 \times 10^7$  КОЕ/мл (таблица). Биопленки изолята 216 оказались чуть более устойчивыми к амикацину, значение МКЭБ составило 512 мкг/мл (таблица). Как и в случае PAO1, галактан не повлиял на МКЭБ амикацина. Аналогичным образом при обработке амикацином биопленок изолята 216, культивированных на полипропиленовых купонах, добавление 1 мг/мл галактана приводило к существенному увеличению количества жизнеспособных клеток по сравнению с использованием только антибиотика (рис. 3).

**Разрушение биопленок галактаном картофеля способствует возобновлению бактериального роста после обработки амикацином.** Необходимо заметить, что хотя биопленки PAO1, обработанные амикацином в концентрации 256 мкг/мл (МКЭБ), не могли возобновить свой рост после помещения в свежую питательную среду, флуоресцентная микроскопия показала, что живые бактерии в таких биопленках сохраняются. По-видимому, эти бактерии находятся в некультивируемом состоянии, что и приводит к наблюдаемому отсутствию бактериального роста после обработки амикацином.

Оказалось, что биопленки, культивированные на полипропиленовых купонах и обрабо-

танные 256 мкг/мл амикацина, способны возобновить бактериальный рост в свежей питательной среде после физического разрушения их структуры с помощью обработки стеклянными шариками. Иначе говоря, наблюдаемое значение МКЭБ амикацина не является в действительности минимальной концентрацией, необходимой для эрадикации биопленок. Эрадикация биопленок в данном случае лишь видимая, обусловленная переходом оставшихся жизнеспособных бактерий в некультивируемое состояние. При этом не только физическое нарушение структуры биопленок, но также и их обработка 1 мг/мл галактана способствовала возобновлению бактериального роста в условиях, в которых клетки в неразрушенных биопленках оставались в некультивируемом состоянии. Этот эффект не мог сказаться на результатах подсчета количества жизнеспособных бактерий в обработанных амикацином биопленках, поскольку в этом случае биопленки подвергаются физическому разрушению. Кроме того, результаты микроскопии свидетельствуют в пользу того, что галактан картофеля действительно защищает бактерии в составе биопленок от действия антибиотиков. Тем не менее тот факт, что обработанные амикацином биопленки одинаково возобновляют рост как после физического разрушения, так и под действием галактана, еще раз демонстрирует влияние галактана на структуру биопленок *P. aeruginosa*.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе было продемонстрировано, что галактан картофеля способен эффективно подавлять образование биопленок *P. aeruginosa* на различных поверхностях, а также частично разрушать сформированные биопленки. Однако при применении совместно с антибиотиками галактан не повысил их эффективность. Напротив, количество жизнеспособных бактерий в биопленках, обработанных антибиотиками в сочетании с галактаном, было существенно выше по сравнению с биопленками, обработанными только антибиотиками.

Галактан картофеля в концентрации 1 мг/мл эффективно препятствовал образованию биопленок *P. aeruginosa* на разных субстратах. Ранее нами было показано, что галактан способен подавлять начальную стадию (5 ч) формирования биопленок клиническим изолятом *P. aeruginosa* 216. В данной работе продемонстрировано, что эффект подавления образования биопленок воспроизводится также для лабораторного штамма *P. aeruginosa* PAO1 и при более длительном времени культивирования (24 ч). Кроме того, галактан оказался способен частично разрушать сформированные биопленки *P. aeruginosa*. При этом галактан, по-видимому, не препятствует первоначальной адгезии бактерий, но предотвращает образование микроколоний и накопление биомассы (рис. 2). Мы предполагаем, что эффект ингибирования образования биопленок галактаном обусловлен тем, что галактан вызывает излишнюю либо неправильную агрегацию бактерий, препятствуя формированию нормальной архитектуры биопленки. Действительно, при отмывании биопленок, культивированных в присутствии галактана, было замечено наличие в планктонной фракции крупных агрегатов. Кроме того, в пользу предположения о чрезмерной агрегации как механизме ингибирования образования биопленок говорит тот факт, что более низкие концентрации галактана, наоборот, стимулируют накопление биомассы в биопленке. По-видимому, меньшие концентрации галактана вызывают меньшую степень агрегации, совместимую с образованием биопленки. Подобный механизм действия не был описан для полисахаридов. В тех случаях, когда влияние полисахаридов на агрегацию бактериальных клеток было исследовано, полисахариды, подавляющие образование биопленок, всегда препятствовали такой агрегации [7, 8, 27, 28]. Однако схожий эффект описан для белка *VipA* *Bordetella holmesii* [32]. Изоляты *B. holmesii*, мутантные по гену *bipA*, при культивировании образуют крупные агрегаты, и этот процесс препят-

ствует формированию биопленок. Наличие же функционального варианта *bipA* предотвращает чрезмерную агрегацию и позволяет *B. holmesii* образовывать нормальные биопленки [32]. Таким образом, хотя белок *VipA*, в отличие от галактана, препятствует агрегации, а не вызывает ее, общий механизм ингибирования формирования биопленок за счет чрезмерной агрегации бактериальных клеток может быть в этих двух случаях схожим.

Молекулярным рецептором галактана, возможно, является лектин *LecA*. *LecA* представляет собой секретируемый лектин, связывающий мономерную галактозу, а также остатки галактозы в составе олиго- и полисахаридов. Наряду с лектином *LecB*, связывающим маннозу и фукозу, *LecA* участвует в образовании биопленок *P. aeruginosa*, а также способствует адгезии к эпителиальным клеткам и, вероятно, является фактором вирулентности [33, 34]. Оба этих лектина являются мишенями для разработки соединений, подавляющих образование биопленок [34, 35]. Ранее мы показали, что галактан способен ингибировать гемагглютинацию, вызванную рекомбинантным *LecA* [22]. Интересно, что один из описанных в литературе ингибиторов *LecA* – галактозилированный гликокластер на основе каликс[4]арена – вызывал агрегацию планктонных клеток при применении в определенном диапазоне концентраций, причем этот эффект не проявлялся в отношении штамма, мутантного по гену *lecA* [36]. Это соединение также подавляло образование биопленок PAO1. Однако данный эффект, по всей видимости, не был связан с ингибированием *LecA* и был обусловлен иным механизмом действия [36]. С другой стороны, наши предварительные эксперименты показывают, что галактан картофеля способствует агрегации планктонных клеток и модификации структуры биопленок *Stenotrophomonas maltophilia* (данные не приведены). При этом лектин *LecA* у этого вида бактерий пока не был обнаружен.

Несмотря на то, что галактан способен ингибировать образование биопленок и частично разрушать уже сформированные биопленки, этот полисахарид защищает бактериальные клетки внутри биопленок от действия антибиотиков при их совместном применении. Механизм подобной защиты неясен. Учитывая то, что на планктонные клетки подобный защитный эффект галактана не распространяется, наиболее вероятным представляется механизм, связанный с частичным ремоделированием структуры биопленки за счет галактана. Подобное ремоделирование может затруднять проникновение антибиотиков к бактериальным

клеткам либо вызывать изменение физиологического состояния части клеток, что, в свою очередь, может способствовать их повышенной устойчивости к антибиотикам. Интересно отметить, что похожий эффект в отношении биопленок *P. aeruginosa* был недавно описан для белка A *Staphylococcus aureus* (SpA) [37]. Показано, что SpA взаимодействует с полисахаридом матрикса биопленок psl и пилиями IV типа [38]. При добавлении SpA к уже сформированным биопленкам подобное взаимодействие приводило к изменению нормальной структуры биопленки и формированию крупных и плотных клеточных агрегатов. Важно, такое изменение структуры биопленки повышало ее устойчивость к обработке тобрамицином – антибиотиком, относящимся, как и амикацин, к классу аминогликозидов [37]. Можно предположить, что, хотя механизмы ремоделирования структуры биопленок галактаном картофеля и SpA различны, подобное ремоделирование, заключающееся, вероятно, в более плотной агрегации бактериальных клеток, приводит к повышению устойчивости бактерий к антибиотикам.

В данной работе было исследовано действие галактана картофеля на биопленки *P. aeruginosa*, в т.ч. эффект совместного применения галактана и антибиотиков ципрофлоксацина и амикацина против биопленок *P. aeruginosa*. Галактан ингибирует образование биопленок *P. aeruginosa* и частично разрушает сформированные биопленки. Предположительно, этот эффект связан с чрезмерной агрегацией бактериальных клеток за счет

взаимодействия с галактаном. Однако галактан не повышает эффективность антибиотиков в отношении биопленок *P. aeruginosa* при их совместном применении. Напротив, галактан защищает бактерии в составе биопленки от действия антибиотиков. По всей видимости, это связано с ремоделированием структуры биопленки галактаном. Похожий эффект в отношении биопленок *P. aeruginosa* был ранее показан для белка A *S. aureus*. Таким образом, маловероятно, что галактан картофеля может быть использован для дальнейшей разработки на его основе препаратов, предназначенных для борьбы с бактериальными биопленками. Тем не менее полученный результат представляет интерес с точки зрения исследования влияния структуры биопленки на ее устойчивость к антибиотикам, показывая тесную взаимосвязь этих характеристик.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России (НИОКР № 115030470038).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность И.Г. Тигановой за штамм *P. aeruginosa* PAO1, О.Ю. Добрыниной за изолят *P. aeruginosa* 216, а также Ю.М. Романовой, любезно предоставившей красителя LIVE/DEAD.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или в какой-либо иной сфере.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 95–108, doi: 10.1038/nrmicro821.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009) Evolving concepts in biofilm infections, *Cell Microbiol.*, **11**, 1034–1043, doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.
- Hoiby, N., Bjarsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35**, 322–332, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Jensen, P.O., Givskov, M., Bjarsholt, T., and Moser, C. (2010) The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **59**, 292–305, doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00706.x.
- Mah, T-F. (2010) Biofilm-specific antibiotic resistance, *Future Microbiol.*, **7**, 1061–1072, doi: 10.2217/fmb.12.76.
- Costerton, J.W. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, **284**, 1318–1322, doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., and Ghigo, J-M. (2006) Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12558–12563, doi: 10.1073/pnas.0605399103.
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., and Yu, W. (2011) Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101, *PLoS One*, **6**, e18514, doi: 10.1371/journal.pone.0018514.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011) Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*, *Bioresour. Technol.*, **102**, 4827–4833, doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.118.
- Sayem, S.M.A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., De Felice, M., and Varcamonti, M. (2011) Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*, *Microb. Cell. Fact.*, **10**, 74, doi: 10.1186/1475-2859-10-74.
- Spano, A., Lagana, P., Visalli, G., Maugeri, T.L., and Gugliandolo, C. (2016) *In vitro* antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14, *Curr. Microbiol.*, **72**, 518–528, doi: 10.1007/s00284-015-0981-9.

12. Wu, S., Liu, G., Jin, W., Xiu, P., and Sun, C. (2016) Antibiofilm and anti-infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Microbiol.*, **7**, 102, doi: 10.3389/fmicb.2016.00102.
13. Brian-Jaisson, F., Molmeret, M., Fahs, A., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Blache, Y., Cerantola, S., and Ortalo-Magne, A. (2016) Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances produced by the marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* strain TC14, *Biofouling*, **32**, 547–560, doi: 10.1080/08927014.2016.1164845.
14. Papa, R., Parrilli, E., Sannino, F., Barbato, G., Tutino, M.L., Artini, M., and Selan, L. (2013) Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, *Res. Microbiol.*, **164**, 450–456, doi: 10.1016/j.resmic.2013.01.010.
15. Kanmani, P., Suganya, K., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Paari, K.A., and Arul, V. (2013) Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by enterococcus faecium MC13 isolated from the gut of fish, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **169**, 1001–1015, doi: 10.1007/s12010-012-0074-1.
16. Kavita, K., Singh, V.K., Mishra, A., and Jha, B. (2014) Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*, *Carbohydr. Polym.*, **101**, 29–35, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.099.
17. Li, Y., Li, Q., Hao, D., Jiang, D., Luo, Y., Liu, Y., and Zhao, Z. (2015) Production, purification, and antibiofilm activity of a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter* sp. B4, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **45**, 192–204, doi: 10.1080/10826068.2014.907180.
18. Pradeepa, Shetty, A.D., Matthews, K., Hegde, A.R., Akshatha, B., Mathias, A.B., Mutalik, S., and Vidya, S.M. (2016) Multidrug resistant pathogenic bacterial biofilm inhibition by *Lactobacillus plantarum* exopolysaccharide, *Bioact. Carbohydrates. Diet. Fibre*, **8**, 7–14, doi: 10.1016/j.bcdf.2016.06.002.
19. Rendueles, O., Travier, L., and Latour-Lambert, P. (2011) Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharide, *MBio*, **2**, e00043-11, doi: 10.1128/mBio.00043-11.
20. Bendaoud, M., Vinogradov, E., Balashova, N.V., Kadoori, D.E., Kachlany, S.C., and Kaplan, J.B. (2011) Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide, *J. Bacteriol.*, **193**, 3879–3886, doi: 10.1128/JB.00311-11.
21. Dos Santos Goncalves, M., Delattre, C., Balestrino, D., Charbonnel, N., Elboutachfati, R., Wadouchi, A., Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., and Forestier, C. (2014) Anti-biofilm activity: a function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide, *PLoS One*, **9**, e99995, doi: 10.1371/journal.pone.0099995.
22. Grishin, A., Karyagina, A.S., Tiganova, I.G., Dobrynina, O.Y., Bolshakova, T.N., Boksha, I.S., Alexeyeva, N.V., Stepanova, T.V., Lunin, V.G., Chuchalin, A.G., and Ginzburg, A.L. (2013) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by LecA-binding polysaccharides, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **42**, 471–472, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.07.003.
23. Vázquez-Rodríguez, A., Vasto-Anzaldo, X.G., Barboza Perez, D., Vázquez-Garza, E., Chapoy-Villanueva, H., García-Rivas, G., Garza-Cervantes, J., Gomez-Lugo, J.J., Gomez-Loredo, A.E., Gonzalez, M.T.G., Zarate, X., and Morones-Ramirez, J.R. (2018) Microbial competition of *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L and *E. coli* increase biosynthesis of non-toxic exopolysaccharide with applications as a wide-spectrum antimicrobial, *Sci. Rep.*, **8**, 798, doi: 10.1038/s41598-017-17908-8.
24. Doghri, I., Lavaud, J., Dufour, A., Bazire, A., Lanneluc, I., and Sable, S. (2017) Cell-bound exopolysaccharides from an axenic culture of the intertidal mudflat *Navicula phyllepta* diatom affect biofilm formation by benthic bacteria, *J. Appl. Phycol.*, **29**, 165–177, doi: 10.1007/s10811-016-0943-z.
25. Bernal, P., and Llamas, M.A. (2012) Promising biotechnological applications of antibiofilm exopolysaccharides, *Microb. Biotechnol.*, **5**, 670–673, doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00359.x.
26. Rendueles, O., Kaplan, J.B., and Ghigo, J.-M. (2013) Antibiofilm polysaccharides, *Environ. Microbiol.*, **15**, 334–346, doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x.
27. Kim, Y., Oh, S., and Kim, S.H. (2009) Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 324–329, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.053.
28. Karwacki, M.T., Kadouri, D.E., Bendaoud, M., Izano, E.A., Sampathkumar, V., Inzana, T.J., and Kaplan, J.B. (2013) Antibiofilm activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 capsular polysaccharide, *PLoS One*, **8**, e63844, doi: 10.1371/journal.pone.0063844.
29. O'Toole, G.A. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay, *J. Vis. Exp.*, **47**, 2437, doi: 10.3791/2437.
30. Mah, T.-F. (2014) Establishing the minimal bactericidal concentration of an antimicrobial agent for planktonic cells (MBC-P) and biofilm cells (MBC-B), *J. Vis. Exp.*, **83**, e50854, doi: 10.3791/50854.
31. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Meth.*, **9**, 676–682, doi: 10.1038/nmeth.2019.
32. Hiramatsu, Y., Saito, M., Otsuka, N., Suzuki, E., Watanabe, M., Shibayama, K., and Kamachi, K. (2016) BipA is associated with preventing autoagglutination and promoting biofilm formation in *Bordetella holmesii*, *PLoS One*, **11**, e0159999, doi: 10.1371/journal.pone.0159999.
33. Imberty, A., Wimmerova, M., Mitchell, E.P., and Gilboa-Garber, N. (2004) Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition, *Microbes. Infect.*, **6**, 221–228, doi: 10.1016/j.micinf.2003.10.016.
34. Grishin, A.V., Krivozubov, M.S., Karyagina, A.S., and Gintsburg, A.L. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials, *Acta Naturae*, **7**, 29–41.
35. Titz, A. (2014) Carbohydrate-based anti-virulence compounds against chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections with a focus on small molecules, in *Carbohydrates as drugs. Topics in medicinal chemistry*, vol. 12 (Seeberger, P., and Rademacher, C., eds), Springer, Chambridge, pp. 169–186, doi: 10.1007/7355\_2014\_44.
36. Boukerb, A.M., Rousset, A., Galanos, N., Mear, J.-B., Thepaut, M., Grandjean, T., Gillon, E., Cecioni, S., Abderrahmen, C., Faure, K., Redelberger, D., Kipnis, E., Desein, R., Havet, S., Darblade, B., Matthews, S.E., de Bentzmann, S., Guery, B., Cournoyer, B., Imberty, A., and Vidal, S. (2014) Antiadhesive properties of glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection, *J. Med. Chem.*, **57**, 10275–10289, doi: 10.1021/jm500038p.
37. Beaudoin, T., Yau, Y.C.W., Stapleton, P.J., Gong, Y., Wang, P.W., Guttman, D.S., and Water, V. (2017) *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance, *NPJ Biofilms Microbiomes*, **3**, 25, doi: 10.1038/s41522-017-0035-0.
38. Armbruster, C.R., Wolter, D.J., Mishra, M., Hayden, H.S., Radey, M.C., Merrihew, G., Maccoss, M.J., Burns, J., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., and Hoffman, L.R. (2016) *Staphylococcus aureus* protein A mediates interspecies interactions at the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*, *MBio*, **7**, e00538-16, doi: 10.1128/mBio.00538-16.

**POLYSACCHARIDE GALACTAN INHIBITS *Pseudomonas aeruginosa* BIOFILM FORMATION BUT PROTECTS PRE-FORMED BIOFILMS FROM ANTIBIOTICS****A. V. Grishin<sup>1,2\*</sup> and A. S. Karyagina<sup>1,2,3\*</sup>**

<sup>1</sup> *Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; E-mail: grishin-a1@yandex.ru, akaryagina@gmail.com*

<sup>2</sup> *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received October 9, 2018

Revised January 21, 2019

Accepted January 28, 2019

Microorganisms residing within a biofilm become more tolerant to antibiotics and other types of adverse impact, and biofilm formation by pathogenic bacteria is an important problem of current medicine. Polysaccharides that prevent biofilm formation are among the promising candidates to help tackle this problem. Earlier we demonstrated the ability of galactan polysaccharide to inhibit biofilm formation by a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Here we investigate the effect of galactan on *P. aeruginosa* biofilms in more detail. Microscopic analysis indicates that galactan does not interfere with adhesion of bacterial cells to the substrate but prevents the build-up of bacterial biomass. Moreover, galactan not only inhibits biofilm formation but partially destroys pre-formed biofilms. Presumably, this activity of galactan is due to excessive aggregation of bacterial cells, which prohibits the formation and maintenance of proper biofilm architecture, or due to some other mechanisms of biofilm structure remodeling. This leads to an unexpected effect, i.e., *P. aeruginosa* biofilms treated with an antibiotic and galactan retain more viable bacterial cells compared to biofilms treated with the antibiotic alone. Galactan is the first polysaccharide demonstrated to have such effect on bacterial biofilms.

*Keywords:* biofilm, galactan, *Pseudomonas aeruginosa*, polysaccharide, antibiotics, tolerance