

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА В ЗАЩИТНОМ ЭФФЕКТЕ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКА АЗИТРОМИЦИНА НА *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*

© 2019 г. М. В. Журина^а, Ю. А. Николаев^а, В. К. Плакунов^а, *

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, 119071 Россия

*e-mail: plakunov@inmi.ru

Поступила в редакцию 28.02.2019 г.

После доработки 25.03.2019 г.

Принята к публикации 01.04.2019 г.

Ключевые слова: биопленки, матрикс, антибиотики, азитромицин, устойчивость к антибиотикам, жизнеспособные бактерии, МТТ

DOI: 10.1134/S0026365619040153

В предыдущей работе мы показали, что грамотрицательная бактерия *Escherichia coli* ET12567 рRAG56, содержащая плазмиду, которая кодирует фермент аминокликозидфосфотрансферазу, инактивирующий канамицин, оказывает защитный эффект при действии антибиотика канамицина на грамположительную бактерию *Micrococcus thailandicus* HB в бинарных биопленках этих двух культур. Аналогичное защитное действие в отношении антибиотика оксациллина проявляет штамм дикого типа *E. coli* K-12 (не содержащий ферментов инактивирующих антибиотики) в бинарных биопленках с грамположительной бактерией *Kocuria rhizophila* 4A-2Ж. В последнем случае нами высказано предположение, что защитный эффект обусловлен барьерной ролью внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) бинарных биопленок, ограничивающего поступление антибиотика внутрь биопленки (Плакунов и соавт., 2019).

Работы, посвященные роли ВПМ как барьера для проникновения антибиотиков в микробные биопленки, не дают однозначного ответа на вопрос о возможности такого защитного эффекта. С одной стороны, в ранних работах постулирована диффузионно-барьерная и сорбционная роль ВПМ в отношении органических веществ, в том числе биоцидов (Flemming, Wingender, 2010), но, с другой стороны, при проведении более глубоких исследований показано, что ВПМ проявляет выраженную специфичность во взаимодействии с органическими и неорганическими веществами в зависимости от своего химического состава и условий окружающей среды и не обязательно ограничивает проникновение биоцидов в биопленку (Flemming, 2016; Tallawi et al., 2016; Singh et al., 2017). Возможно, что противоречивые данные о роли ВПМ

обусловлены недооценкой особенностей его состава и строения даже у близких в таксономическом и физиологическом отношении микроорганизмов. Для корректного выявления защитной роли ВПМ требуется сопоставление микроорганизмов, сходных во всех отношениях, кроме особенностей архитектуры ВПМ.

Целью данной работы было изучение защитного эффекта в отношении антибиотика азитромицина, оказываемого штаммом WT *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 на мутантный биосенсорный штамм *C. violaceum* CV026.

Эти штаммы идентичны по биохимическим и ростовым характеристикам, но мутантный штамм неспособен синтезировать N-ацилгомосеринлактоны (C₆-АГЛ) — сигнальные компоненты глобальной регуляторной системы quorum sensing, поскольку у него в результате инсерции транспозона мини Tn5 инактивирован ген *cvil*, кодирующий синтетазу C₆-АГЛ, вследствие чего его биопленки содержат дефектный ВПМ, значительно меньшей толщины и упрощенной архитектуры, чем у штамма дикого типа (Журина и соавт., 2013; Катаева et al., 2014). Поскольку моновидовые биопленки мутанта примерно на порядок чувствительнее к антибиотикам азитромицину, чем моновидовые биопленки штамма WT, данные объекты позволяют проверить возможность проявления защитной реакции, связанной с барьерной ролью ВПМ. Статистическую обработку результатов проводили как в предыдущей статье (Плакунов и соавт., 2019).

Для выявления защитного эффекта *C. violaceum* WT в отношении мутанта CV026 использовали ранее описанные подходы (Плакунов и соавт., 2019) с некоторыми изменениями. Культуры хранили на столбиках полужидкой (0.3% агара) среды

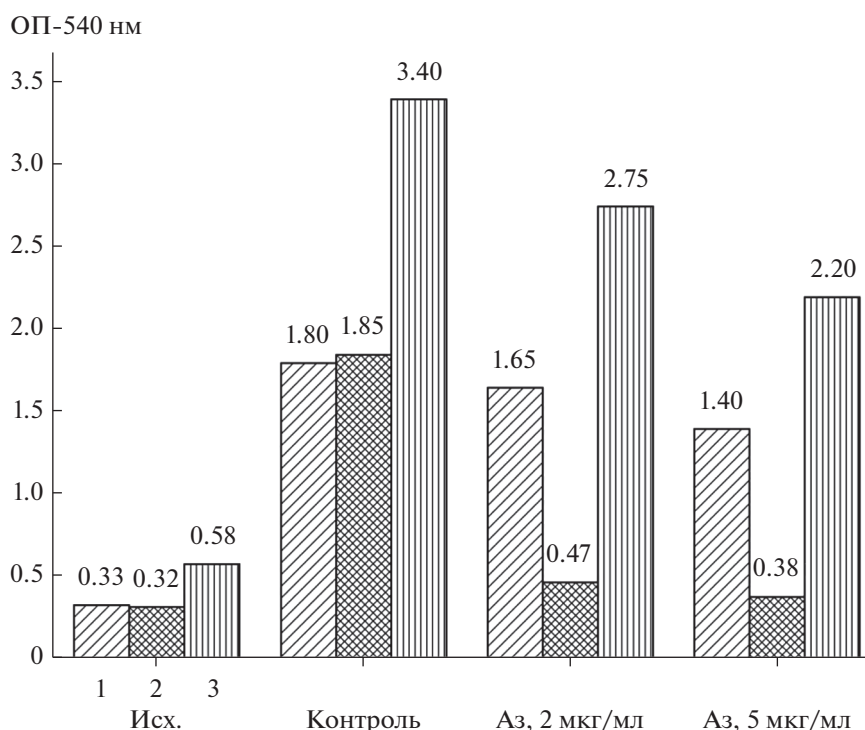


Рис. 1. Количество метаболически активных бактерий в моновидах и бинарной предформированных биопленках в отсутствие и в присутствии азитромицина (Аз), измеряемое по восстановлению МТТ: 1 – моновида биопленка *C. violaceum* WT; 2 – моновида биопленка мутанта *C. violaceum* CV026; 3 – бинарная биопленка (CV026 + WT).

ЛА (среда LB с добавлением 0.3% агара) под вазелиновым маслом при комнатной температуре. Культуры перед опытом рассеивали методом “истощающего штриха” на чашки Петри с плотной средой ЛА (среда LB с 2% агара). Выбирали типичную колонию и засеивали в 50 мл жидкой среды LB. Культуры выращивали 24 ч при 30°C на качалке (150 об./мин), разбавляли стерильной средой LB до условной оптической плотности (светопоглощение + светорассеяние), равной 1, и наносили по 50 мкл для получения биопленок-колоний на фильтры из стекловолна размером 2.5 × 2.5 см (Whatman GF/F, диаметр пор 0.6–0.8 мкм). Фильтры размещали на поверхности плотной среды ЛА и инкубировали 24 ч при комнатной температуре для предформирования биопленок. После этого фильтры стерильно переносили на чашки Петри с плотной средой ЛА, содержащей 2 или 5 мкг/мл антибиотика азитромицина. Часть фильтров использовали для определения исходного содержания метаболически активных бактерий. Контрольные фильтры накладывали на чашки без антибиотика. Используемые концентрации азитромицина являются бактериостатическими для планктонных культур обоих штаммов и подавляют рост моновидовых биопленок мутанта на 70–80%, практически не влияя на рост моновидовых биопленок штамма WT (Мартынов и соавт., 2015). Чашки с фильтрами инкубировали

48 ч при 30°C и окрашивали МТТ, как описано в предыдущей статье (Плакунов и соавт., 2019). Данные определения количества метаболически активных бактерий показаны на рис. 1.

Как можно судить по результатам, представленным на рис. 1, *C. violaceum* WT проявляет достоверный защитный эффект в отношении мутанта CV026, поскольку количество метаболически активных бактерий в бинарной биопленке превышает их суммарное количество в моновидах биопленках на 30% (при 2 мкг/мл азитромицина) и на 24% (при 5 мкг/мл азитромицина), что соответствует уровню значимости $p < 0.05$. Поскольку ранее нами было показано, что присутствие азитромицина не влияет на скорость восстановления МТТ *C. violaceum*, а использованные концентрации азитромицина практически не влияют на рост биопленок *C. violaceum* WT, это превышение можно объяснить только увеличением роста мутанта CV026 в составе бинарной биопленки.

К сожалению, в данных экспериментах нам не удалось применить ранее разработанный кинетический метод выявления защитного эффекта, основанный на различиях скоростей восстановления МТТ изучаемыми микроорганизмами (Плакунов и соавт., 2019), поскольку у обоих изученных штаммов скорость восстановления МТТ практически одинакова. Поэтому в качестве альтерна-

тивного доказательства защитного эффекта использовали подсчет числа КОЕ. Сложность задачи заключалась в том, что колонии изучаемых штаммов морфологически практически не различаются, поскольку молодые колонии штамма WT не окрашены и синтезируют пигмент виолацеин только на поздних стадиях роста. А мутант CV026 вообще неспособен синтезировать этот пигмент в отсутствие C_6 -АГЛ в среде, и его колонии также не окрашены. Как нам удалось установить, добавление в среду небольших количеств (не более 1 мкг/мл) C_6 -АГЛ вызывает синтез виолацеина и окрашивание колоний мутанта CV026, но не влияет на окраску колоний штамма WT (Мартыанов и соавт., 2018). Более того, как показали предварительные опыты, вносить C_6 -АГЛ в бинарную био пленку нет необходимости, поскольку его количество, образуемое и выделяемое в среду штаммом WT, достаточно для синтеза виолацеина и окрашивания колоний мутанта CV026. Это позволяет легко выявить колонии мутанта в бинарной био пленке в присутствии штамма WT (рис. 2 и рисунок S).

Подсчет числа КОЕ проводили по использованной ранее методике (Плакунов и соавт., 2019). Количественные данные подсчета числа КОЕ в бинарных био пленках для каждого из данных штаммов представлены на рис. 2.

Очевидно, что число жизнеспособных бактерий мутанта *C. violaceum* CV026 в бинарной био пленке (2.7×10^{10}) многократно превышает их число в моновидовой био пленке при той же концентрации (2 мкг/мл) азитромицина (1.3×10^9). Аналогичная ситуация при концентрации азитромицина 5 мкг/мл: в моновидовой био пленке КОЕ для *C. violaceum* CV026 составляет 1.1×10^9 , а в бинарной био пленке — 1.3×10^{10} . Таким образом, *C. violaceum* WT с нормальным ВПМ оказывает защитное действие на мутант с дефектным ВПМ.

Наиболее вероятной причиной этого эффекта является связывание антибиотика компонентами матрикса *C. violaceum* WT. Средняя толщина матрикса био пленок *C. violaceum* WT (284 нм), измеренная методом лазерной интерференционной микроскопии, почти на порядок превышает среднюю толщину матрикса био пленок мутанта *C. violaceum* CV026 (30 нм) (Журина и соавт., 2013). Методом окрашивания матрикса с помощью специфичного к полисахаридам красителя диметилметиленового синего нами было показано значительное (почти на порядок) снижение содержания отрицательно заряженных полисахаридов в матриксе био пленок мутанта *C. violaceum* CV026 по сравнению с исходным штаммом *C. violaceum* WT (Мартыанов и соавт., 2015). Поскольку молекула азитромицина обладает основными свойствами, он активно связывается с кислыми полисахаридами, что и может служить основной причиной барьерной функции

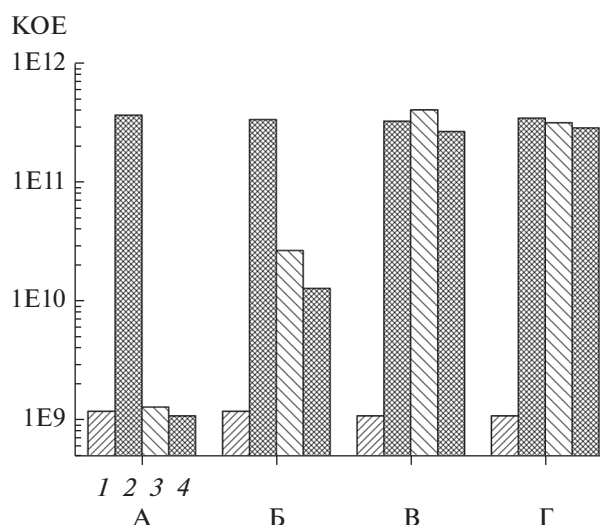


Рис. 2. Число КОЕ: в моновидовой (А) и бинарной (Б) предформированных био пленках *C. violaceum* CV026; а также в моновидовой (В) и бинарной (Г) предформированных био пленках *C. violaceum* WT. 1 — исходная био пленка; 2 — контроль без азитромицина; 3—4 — в присутствии азитромицина (3 — 2 мкг/мл; 4 — 5 мкг/мл).

матрикса био пленок *C. violaceum* WT в отношении этого антибиотика.

Как мы предполагаем, защитный эффект в бинарной био пленке проходит два этапа (об этом можно судить по появлению окраски колоний, вызванной синтезом виолацеина, образование которого, как известно, является индикатором синтеза ВПМ). На первом этапе формирующийся ВПМ штамма *C. violaceum* WT защищает клетки мутанта от действия антибиотика. В стадии предформирования био пленки концентрация C_6 -АГЛ, по-видимому, не достигает величины, необходимой для восстановления синтеза матрикса мутантом, поскольку биосинтез виолацеина у мутанта *C. violaceum* CV026 индуцируется при более низких концентрациях C_6 -АГЛ, чем синтез ВПМ (Журина и соавт., 2013), а предформированные бинарные био пленки не окрашены. На втором этапе роста уже предформированной бинарной био пленки мутант может приобретать некоторую способность к нормальному синтезу ВПМ (индикатором чего является окрашивание его клеток, вызванное синтезом виолацеина), а, следовательно, к защитному действию ВПМ штамма *C. violaceum* WT теоретически может частично добавиться собственный защитный эффект ВПМ мутанта *C. violaceum* CV026.

Таким образом, показано, что ВПМ может играть важную роль в устойчивости микробных био пленок к антибиотикам.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках госзадания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Журина М.В., Кострикина Н.А., Паршина Е.А., Стрелкова Е.А., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Плакунов В.К. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 502–509.
- Zhurina M.V., Kostrikina N.A., Parshina E.Yu., Strelkova E.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Plakunov V.K. Visualization of the extracellular polymeric matrix of *Chromobacterium violaceum* biofilms by microscopic methods // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 517–524.
- Мартьянов С.В., Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. 2015. Т. 84. № 1. С. 27–36.
- Mart'yanov S.V., Zhurina M.V., El'Registan G.I., Plakunov V.K. Activation of formation of bacterial biofilms by azithromycin and prevention of this effect // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 723–731.
- Мартьянов С.В., Летаров А.В., Иванов П.А., Плакунов В.К. Стимуляция биосинтеза виолацеина в биопленках *Chromobacterium violaceum* под воздействием диметилсульфоксида // Микробиология. 2018. Т. 87. № 3. С. 325–329.
- Mart'yanov S.V., Letarov A.V., Ivanov P.A., Plakunov V.K. Stimulation of violacein biosynthesis in *Chromobacterium violaceum* biofilms in the presence of dimethyl sulfoxide // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 437–440.
- Плакунов В.К., Николаев Ю.А., Ганнесен А.В., Чемаева Д.С., Журина М.В. Новый подход к выявлению защитной роли *Escherichia coli* в отношении грамположительных бактерий при действии антибиотиков на бинарные биопленки // Микробиология. 2019. Т. 88. № 3. С. 288–296.
- Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming H.C. EPS-Then and Now // Microorganisms. 2016. V. 4. Pii. E41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>
- Kamaeva A.A., Vasilchenko A.S., Deryabin D.G. Atomic force microscopy reveals a morphological differentiation of *Chromobacterium violaceum* cells associated with biofilm development and directed by N-hexanoyl-L-homoserine lactone // PLoS One. 2014. V. 9. e103741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103741>
- Singh S., Singh S.K., Chowdhury I., Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents // Open Microbiol. J. 2017. V. 11. P. 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
- Tallawi M., Opitz M., Lieleg O. Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges // Biomater. Sci. 2017. V. 2. P. 887–900. <https://doi.org/10.1039/c6bm00832a>

Role of the Extracellular Polymer Matrix in Azithromycin Protection of *Chromobacterium violaceum* Biofilms

M. V. Zhurina¹, Yu. A. Nikolaev¹, and V. K. Plakunov¹. *

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: plakunov@inmi.ru

Received February 28, 2019; revised March 25, 2019; accepted April 1, 2019

Keywords: biofilms, matrix, antibiotics, azithromycin, antibiotic resistance, viable bacteria, MTT