

## ДИНАМИКА ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЁНОК КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМИ ШТАММАМИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Ситникова К.О.<sup>1</sup>,  
Немченко У.М.<sup>1</sup>,  
Воропаева Н.М.<sup>1</sup>,  
Григорова Е.В.<sup>1</sup>,  
Савилов Е.Д.<sup>1,2</sup>,  
Маркова Ю.А.<sup>3</sup>,  
Белькова Н.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

<sup>2</sup> Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100, Россия)

<sup>3</sup> ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия)

Автор, ответственный за переписку:  
**Ситникова Ксения Олеговна**,  
e-mail: butakovaksenia505@gmail.com

### РЕЗЮМЕ

**Обоснование.** Образование биоплёночных структур микроорганизмами, обитающими во внутрибольничной среде, является серьёзной проблемой медицины. Для проведения корректных экспериментальных исследований необходимо знать скорость и эффективность формирования биоплёнок клинически значимыми видами условно-патогенных бактерий.

**Цель.** Изучить кинетику роста планктонных культур и скорость формирования биоплёнок клинически значимыми возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, для обоснования методологии дальнейших исследований.

**Материалы и методы.** Использованы штаммы из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микроэкологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека». Эксперименты проведены с условно-патогенными микроорганизмами сем. *Enterobacteriaceae* и неферментирующими грамотрицательными бактериями. Проводилось измерение оптической плотности, определение общего микробного числа клеточной суспензии и оценка морфологической структуры биоплёнки с помощью светового микроскопа на стерильных покровных стёклах для видов *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Serratia marcescens*.

**Результаты.** Продолжительность лаг-фазы кинетической кривой роста клеток варьировала у изолятов *S. marcescens*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* от 1 до 4 и 6 часов культивирования соответственно. Несмотря на это, фаза экспоненциального роста была у всех тестируемых изолятов одинаковой и составила 4 часа. Таким образом, изоляты клинически значимых видов выходили на стационарную фазу роста через 5–10 часов культивирования и были охарактеризованы как быстрорастущие. На абиотических поверхностях через 8 часов инкубирования тестируемых культур наблюдали начальные стадии образования биоплёночных структур, через 20 часов визуализировали сформированную многослойную биоплёнку, через 24 часа происходила сукцессия, на место отслоившихся структур прикреплялись новые единичные клетки.

**Заключение.** Полученные данные по временной продолжительности основных стадий кинетики роста в сопоставлении с визуализацией процесса формирования биоплёночных структур на абиотических поверхностях должны быть учтены при изучении воздействия дезинфицирующих, антисептических средств и антибактериальных лекарственных препаратов на планктонные клетки и биоплёночные ассоциации клинически значимых условно-патогенных микроорганизмов.

**Ключевые слова:** кинетика роста бактерий, формирование биоплёнки, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, микроскопия

Статья получена: 28.06.2022

Статья принята: 03.10.2022

Статья опубликована: 08.12.2022

**Для цитирования:** Ситникова К.О., Немченко У.М., Воропаева Н.М., Григорова Е.В., Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Белькова Н.Л. Динамика образования биоплёнок клинически значимыми штаммами условно-патогенных бактерий. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 119-128. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.13

## THE EFFECTIVENESS OF BIOFILM FORMATION OF DAILY CULTURES OF CLINICALLY SIGNIFICANT STRAINS OF OPPORTUNISTIC BACTERIA

Sitnikova K.O.<sup>1</sup>,  
Nemchenko U.M.<sup>1</sup>,  
Voropaeva N.M.<sup>1</sup>,  
Grigorova E.V.<sup>1</sup>,  
Savilov E.D.<sup>1,2</sup>,  
Markova Yu.A.<sup>3</sup>,  
Belkova N.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

<sup>2</sup> Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Yubileyniy 100, Irkutsk 664049, Russian Federation)

<sup>3</sup> Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants (Lermontova str. 132, Irkutsk 664033, Russian Federation)

Corresponding author:

**Kseniya O. Sitnikova,**

e-mail: butakovaksenia505@gmail.com

### ABSTRACT

**Background.** The formation of biofilm structures by microorganisms living in the hospital environment is a serious medical problem. To conduct correct experimental studies, it is necessary to know the speed and efficiency of biofilm formation by clinically significant species of opportunistic bacteria.

**Aim:** to study the kinetics of plankton culture growth and the rate of biofilm formation by clinically significant pathogens of infections associated with medical care to substantiate the methodology of further research.

**Materials and methods.** The strains from the working collection of the Laboratory for Microbiome and Microecology of the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems were used. Experiments were carried out with conditionally pathogenic microorganisms of the Enterobacteriaceae family and non-fermenting gram-negative bacteria. The optical density was measured, the total microbial number of the cell suspension was determined, and the morphological structure of the biofilm was evaluated using a light microscope on sterile cover glasses for the species *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*.

**Results.** The duration of the lag phase of the kinetic curve of cell growth varied in isolates of *S. marcescens*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* from 1 to 4 and 6 hours of cultivation, respectively. Despite this, the exponential growth phase was the same for all tested isolates and amounted to 4 hours. Thus, isolates of clinically significant species entered the stationary growth phase after 5–10 hours of cultivation and were characterized as fast-growing. On abiotic surfaces, after 8 hours of incubation of the tested cultures, the initial stages of the formation of biofilm structures were observed, after 20 hours the formed multilayer biofilm was visualized, after 24 hours succession occurred, new single cells were attached to the place of the detached structures.

**Conclusion.** The data obtained on the duration of the main stages of growth kinetics compared with the visualization of the formation of biofilm structures on abiotic surfaces should be taken into account when studying the effects of disinfectants, antiseptics and antibacterial drugs on planktonic cells and biofilm associations of clinically significant opportunistic microorganisms.

**Key words:** kinetics of bacterial growth, biofilm formation, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, microscopy

**For citation:** Sitnikova K.O., Nemchenko U.M., Voropaeva N.M., Grigorova E.V., Savilov E.D., Markova Yu.A., Belkova N.L. The effectiveness of biofilm formation of daily cultures of clinically significant strains of opportunistic bacteria. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 119-128. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.13

Received: 28.06.2022

Accepted: 03.10.2022

Published: 08.12.2022

## ВВЕДЕНИЕ

По данным Национального института здравоохранения, более 80 % микробных инфекций связаны с формированием биоплёночных структур [1, 2]. В настоящее время особое внимание уделяется микроорганизмам, выделенным в группу ESKAPE (от англ. *escape* – ускользать, избегать, спасаться), к которым отнесены шесть клинически значимых бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью и вызывающих высокую смертность (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), метициллин-резистентный *S. aureus* (MRSA), а также группа устойчивых к ванкомицину штаммов энтерококков (VRE). Эти патогены часто формируют поливидовые биоплёнки, в результате чего они являются причиной опасных внутрибольничных инфекций, особенно для тяжелобольных людей с ослабленным иммунитетом [3–6].

В клинической практике важно владеть информацией о способности штаммов условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) формировать устойчивые биоплёночные консорциумы [7]. Актуальным является понимание всех этапов этого процесса: от стадии прикрепления к поверхности единичных клеток, через образование микроколоний и формирование многослойной зрелой биоплёнки до её сукцессии, при которой происходит частичное отслаивание разного размера агрегатов и дальнейшее освобождение поверхности для будущей адгезии свободноживущих клеток с последующим созданием микроколоний. Использование новых экспериментальных подходов к изучению биоплёночных консорциумов позволяет понять сложность организации таких структур [8].

Формирование биоплёнки на биотической или абиотической поверхности зависит от конкретного штамма, питательной среды, свойств и особенностей поверхности [9, 10]. Биоплёнокообразование сопровождается выделением внеклеточных полимеров, обеспечивающих прочную адгезию [11, 12], что приводит к фундаментальным изменениям в бактериальном росте и экспрессии генов [13].

Нашими предыдущими исследованиями показано, что УПМ, выделенные из внутрибольничной среды, различаются по скорости формирования биоплёнки [14–16]. Очевидно, что для дальнейшего развития экспериментальных исследований по изучению свойств клинически значимых условных патогенов в биоплёночных ассоциациях надо знать, как происходит процесс биоплёнокообразования, а именно, как долго биоплёнка находится на стадии созревания и многослойности, то есть когда биоплёночный консорциум может быть наиболее устойчив к антибактериальным, дезинфицирующим и антисептическим средствам.

В ходе совместных исследований, проведённых с детским многопрофильным стационаром регионального уровня (г. Иркутск), была сформирована коллекция штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Выделенные культуры относились к неферментирующим грамотрица-

тельным бактериям (39 штаммов), сем. *Enterobacteriaceae* (44 штамма), к другим видам (9 штаммов). Подробная характеристика указанных культур представлена в статьях, опубликованных нами ранее [14, 16].

Таким образом, **целью настоящего исследования** стало изучить кинетику роста планктонных культур и скорость формирования биоплёнок клинически значимыми возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, для обоснования методологии дальнейших исследований.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Подготовка культур и определение оптической плотности

Всего было выбрано 10 штаммов трёх клинически значимых видов: *Pseudomonas aeruginosa* (изоляты № 6, 12 и 13), *Klebsiella pneumoniae* (№ 16, 23 и 40) и *Serratia marcescens* (№ 22 и 37). Перед экспериментом культуры были синхронизированы. Суточные культуры выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ), концентрацию клеток в суспензии готовили по стандарту мутности МакФарланда равному 1, что соответствует  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл. Аликвоты суточных культур по 2 мл вносили в 200 мл свежего МПБ и инкубировали на шейкере (200 об./мин) при 37 °С. Измерение оптической плотности (ОП) и определение общего микробного числа (ОМЧ) проводили через 2, 4, 9, 12 и 24 часа культивирования. Для определения ОП клеточной суспензии тестируемых культур использовали 96-луночный стерильный плоскостонный пластиковый иммунологический планшет, с внесением в него 150 мкл клеточной суспензии в трёх повторностях. Контролем фона служил стерильный МПБ, так же вносимый в трёх повторностях по 150 мкл. ОП измеряли на микропланшетном фотометре STAT FAX®4300 (Awareness Technology Inc., USA) при длине волны 492 нм. Рассчитывали среднее значение ОП для всех измерений [14].

### Определение общего микробного числа

Начальную концентрацию клеток принимали равной для всех тестируемых культур. Плотность бактериальных суспензий доводили до 1 по стандарту мутности МакФарланда, в экспериментах использовали их  $\times 100$  разведение ( $3 \times 10^6$  КОЕ/мл). Для определения ОМЧ готовили серийные разведения до  $10^{-8}$  кл./мл. Через 2 и 4 часа культивирования посев культуры производили из второго, третьего и четвёртого разведений. Через 9 и 12 часов культивирования высев производили из шестого, седьмого и восьмого разведений. Высев проводили на мясопептонный агар (МПА), чашки инкубировали в термостате при 37 °С. Учёт ОМЧ проводили через 24 часа путём подсчёта выросших колоний. Рассчитывали логарифм lgКОЕ/мл, а также его среднее значение и стандартное отклонение.

### Оценка морфологической структуры биоплёнки

Оценку морфологической структуры биоплёнки проводили для 10 изолятов *P. aeruginosa*, 9 изолятов

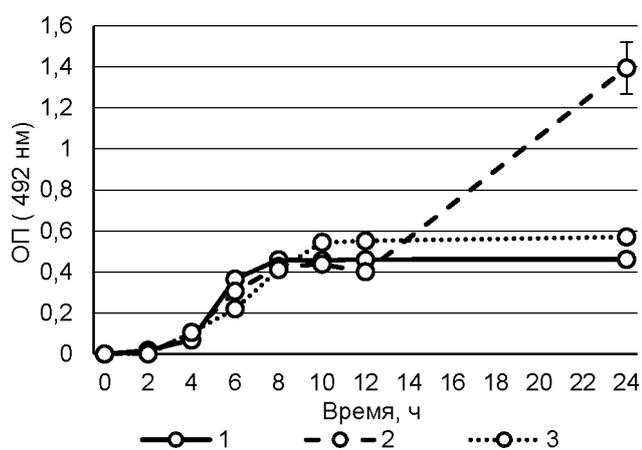
*K. pneumoniae* и 1 изолята *S. marcescens*. Готовили суточную культуру в МПБ, концентрацию клеток в суспензии доводили до  $10^6$  КОЕ/мл. ОП приготовленной суспензии оценивали, как было описано выше. Для эксперимента по формированию биоплёнки на абиотических поверхностях в стерильные чашки Петри вносили 20 мл клеточной суспензии и помещали пять покровных стёкол. Чашки культивировали в термостате при 37 °С. Рост культуры и процессы образования биоплёнок оценивали через 2, 4, 8, 20 и 24 часа инкубации. Проводили измерение ОП клеточной суспензии на микропланшетном фотометре STAT FAX®4300 (Awareness Technology Inc., USA) при длине волны 492 нм и последовательно извлекали стёкла из бульона для изготовления микроскопических препаратов. Стёкла аккуратно промывали физиологическим раствором, после непродолжительного подсушивания быстро фиксировали в пламени спиртовки с последующей окраской в течение часа 1%-м раствором генцианвиолета [17]. Окрашенные стёкла промывали дистиллированной водой. Стадии биоплёнокообразования исследовали под микроскопом и фотографировали (не менее 10 полей зрения на каждое стекло) при помощи программы обработки и анализа изображения Zeiss Efficient Navigation (ZEN core v. 3.0; Karl Zeiss, Германия).

Данная работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» и УНУ «Коллекция микробиоты человека Иркутской области» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск).

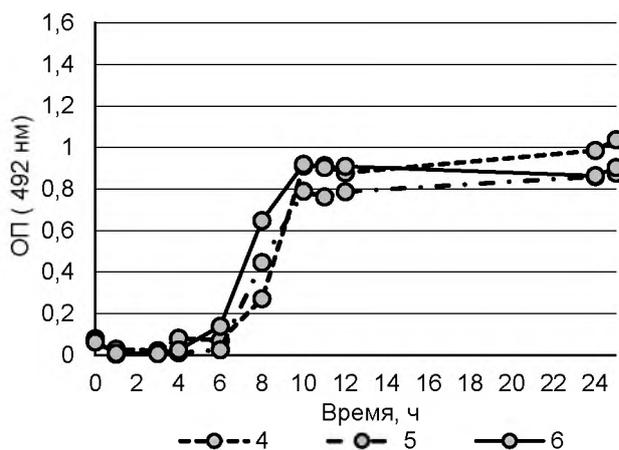
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Все тестируемые изоляты трёх клинически значимых видов бактерий показали высокую скорость роста в условиях интенсивной аэрации. Основные отличия в характере роста культур заключались в разной продолжительности лаг-фазы (рис. 1). Так, наименьшая продолжительность этой фазы была отмечена для изолятов *Serratia marcescens* и составила 1 час инкубирования. Для штаммов *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* продолжительность лаг-фазы составила 4 и 6 часов соответственно, при этом для штаммов *P. aeruginosa* наблюдали более слабый прирост клеток по сравнению с *K. pneumoniae*.

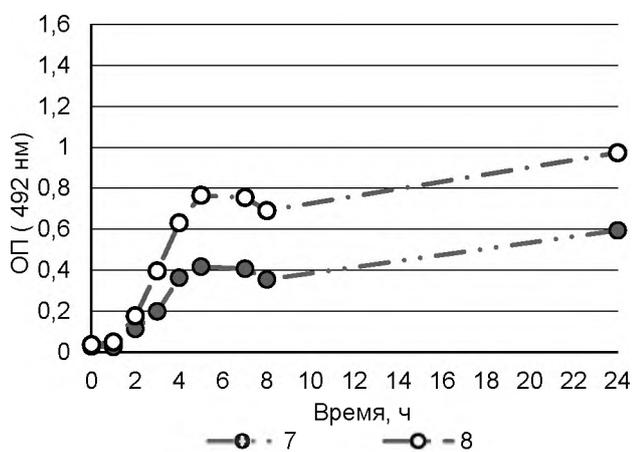
У всех культур отмечена одинаковая продолжительность фазы экспоненциального роста, при этом культуры достигали разной оптической плотности. Наимень-



а



б



в

**РИС. 1.**

Кинетика роста клинически значимых видов условно-патогенных микроорганизмов в условиях интенсивной аэрации, регистрируемая по оптической плотности (492 нм): **а** – *P. aeruginosa* (1 – изолят № 6; 2 – № 12; 3 – № 13); **б** – *K. pneumoniae* (4 – изолят № 16; 5 – № 23; 6 – № 40); **в** – *S. marcescens* (7 – изолят № 22; 8 – № 37)

**FIG. 1.**

Kinetics of growth of clinically significant species of opportunistic microorganisms under conditions of intensive aeration, recorded by optical density (492 nm): **а** – *P. aeruginosa* (1 – isolate No. 6; 2 – No. 12; 3 – No. 13); **б** – *K. pneumoniae* (4 – isolate No. 16; 5 – No. 23, 6 – No. 40); **в** – *S. marcescens* (7 – isolate No. 22; 8 – No. 37)

шая ОП среди всех исследуемых изолятов в конце экспоненциальной фазы отмечена у штаммов *P. aeruginosa* и изолята *S. marcescens* № 22, она составила  $0,432 \pm 0,020$  и  $0,418 \pm 0,002$  соответственно, чуть выше – у второго изолята *S. marcescens* № 37 ( $0,766 \pm 0,010$ ), и максимальная – у штаммов *K. pneumoniae* ( $0,873 \pm 0,059$ ).

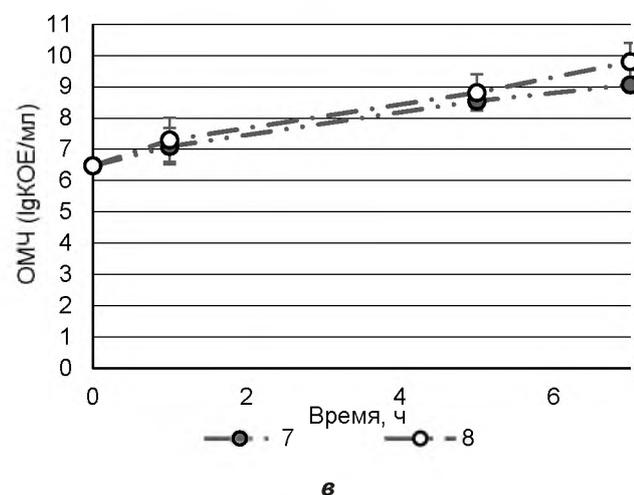
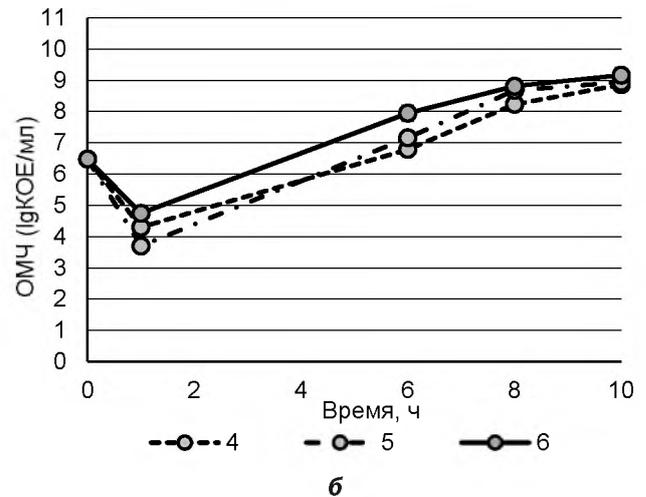
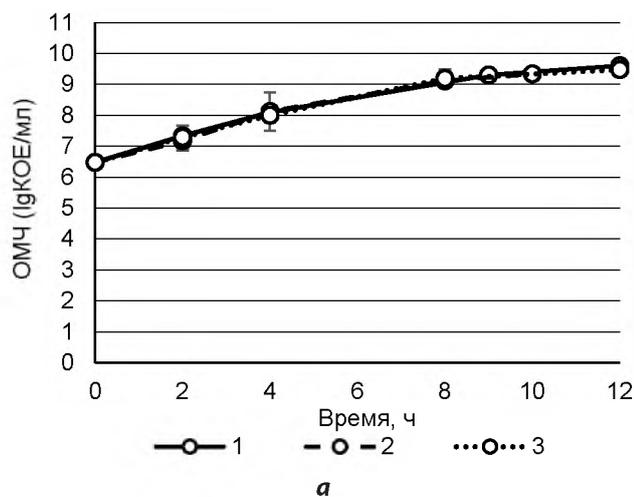
В фазе стационарного роста максимальная ОП также отмечена у изолятов *K. pneumoniae* ( $0,858 \pm 0,052$ ), минимальная – у штаммов *P. aeruginosa* ( $0,471 \pm 0,062$ ). Следует отметить, что у изолятов *K. pneumoniae* стационарная фаза роста наступила через 10 часов от начала эксперимента, через 8 часов – у *P. aeruginosa* и через 5 часов – у *S. marcescens*.

При учёте индекса общего микробного числа были получены сопоставимые значения общего титра микробных клеток вне зависимости от значений ОП исследуемых культур. Так, несмотря на то что через час после начала эксперимента титр клеток *K. pneumoniae* незначительно снижается ( $4,25 \pm 0,43$  IgKOE/мл) по сравнению с изолятами *P. aeruginosa* ( $7,27 \pm 0,07$  IgKOE/мл) и *S. marcescens* ( $7,20 \pm 0,10$  IgKOE/мл), в стационарной фазе роста для всех культур отмечали сопоставимые значения общего титра микробных клеток (рис. 2). Для штаммов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. marcescens*

значения ОМЧ составили  $9,54 \pm 0,06$ ,  $8,99 \pm 0,13$  и  $9,43 \pm 0,37$  IgKOE/мл соответственно.

В эксперименте, кроме измерения ОП, были сделаны микрофотографии разных стадий биоплёнкообразования клинически значимыми видами на абиотической поверхности. Все исследуемые изоляты показали уверенный рост клеточных консорциумов. Одинаковая продолжительность инкубации позволила проследить этапы формирования клеточных консорциумов и определить степень и интенсивность биоплёнкообразования. Так, изоляты *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. marcescens*, в основном, образовывали многослойные и плотные структуры. Ввиду того, что изоляты одного вида демонстрировали сходную тенденцию при формировании биоплёнок, микрофотографии приведены для одного изолята каждого вида микроорганизма: изолят № 48 – *P. aeruginosa* (рис. 3), № 49 – *K. pneumoniae* (рис. 4), № 83 – *S. marcescens* (рис. 5). В начале лаг-фазы, через 2 часа от начала эксперимента, для всех тестируемых культур на стёклах отмечены только единичные клетки, поэтому микрофотографии этой стадии не приводятся.

Измерения ОП культур подтвердили, что клинические виды *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. marcescens*

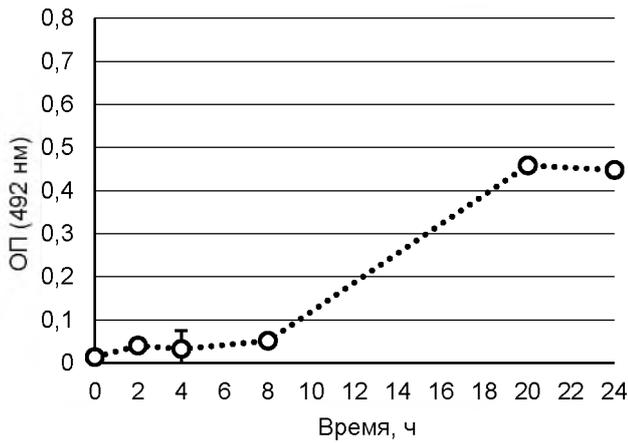


**РИС. 2.**

Кинетика роста клинически значимых видов условно-патогенных микроорганизмов в условиях интенсивной аэрации, регистрируемая по учёту общего микробного числа (IgKOE/мл): **а** – *P. aeruginosa* (1 – изолят № 6; 2 – № 12; 3 – № 13); **б** – *K. pneumoniae* (4 – изолят № 16; 5 – № 23; 6 – № 40); **в** – *S. marcescens* (7 – изолят № 22; 8 – № 37)

**FIG. 2.**

Kinetics of growth of clinically significant species of opportunistic microorganisms under conditions of intensive aeration, recorded by taking into account the total microbial number (IgC-FU/ml): **a** – *P. aeruginosa* (1 – isolate No. 6; 2 – No. 12; 3 – No. 13); **b** – *K. pneumoniae* (4 – isolate No. 16; 5 – No. 23; 6 – No. 40); **v** – *S. marcescens* (7 – isolate No. 22; 8 – No. 37)



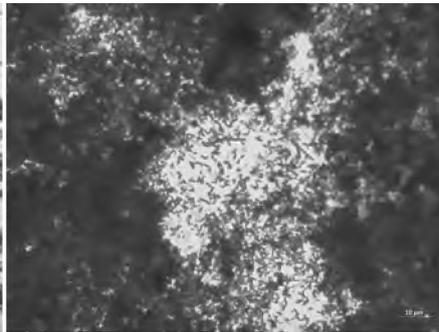
**а**



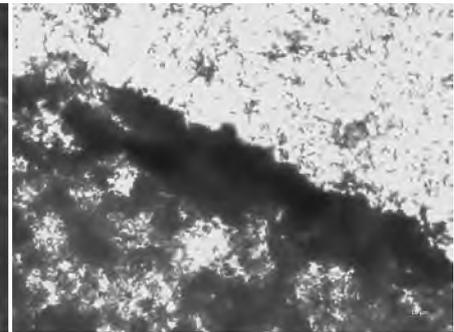
**б**



**в**



**г**



**д**

**РИС. 3.**

Динамика роста клеточной суспензии (**а**) и стадии биоплёнокообразования *P. aeruginosa* на абиотической поверхности: **б** – через 4 часа от начала эксперимента; **в** – через 8 часов; **г** – через 20 часов; **д** – через 24 часа

**FIG. 3.**

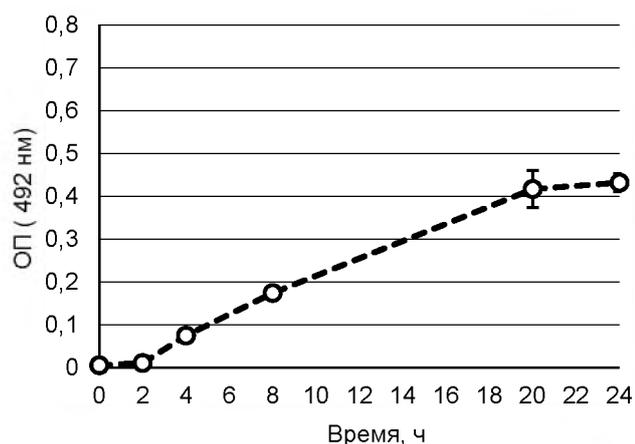
Dynamics of growth of cell suspension (**a**) and the stage of biofilm formation of *P. aeruginosa* on the abiotic surface: **б** – 4 hours after the start of the experiment; **в** – after 8 hours; **г** – after 20 hours; **д** – after 24 hours

обладали значительной скоростью роста и выходили на экспоненциальную фазу через 8, 4 и 1 час инкубирования соответственно (рис. 3а, 4а, 5а). На микрофотографиях видно, что в это время наблюдался активный процесс прикрепления клеток к поверхности покровных стёкол. Так, через 4 часа культивирования на покровных стёклах наблюдали крупные, одиночные клетки *P. aeruginosa*, длинные неделящиеся цепочки, через 8 часов появились одиночные скопления, указывающие на начальные стадии формирования биоплёночных структур (рис. 3б, в). При культивировании штаммов № 49 *K. pneumoniae* и № 83 *S. marcescens* на абиотической поверхности через 4 часа наблюдали большое количество крупных клеток, расположенных как поодиночке, так и в небольших скоплениях (рис. 4б, 5б). Через 8 часов культуры *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* формировали крупные скопления из мелких клеток, создавая как монослой, так и более или менее выраженные многослойные участки (рис. 3в, 4в). Для изолятов *S. marcescens* слоистость биоплёнки была более выражена (рис. 5в). Таким образом, к началу экспоненциальной фазы роста все культуры показали наличие фрагментарного монослоя биоплёнки. Сформированная многослойная

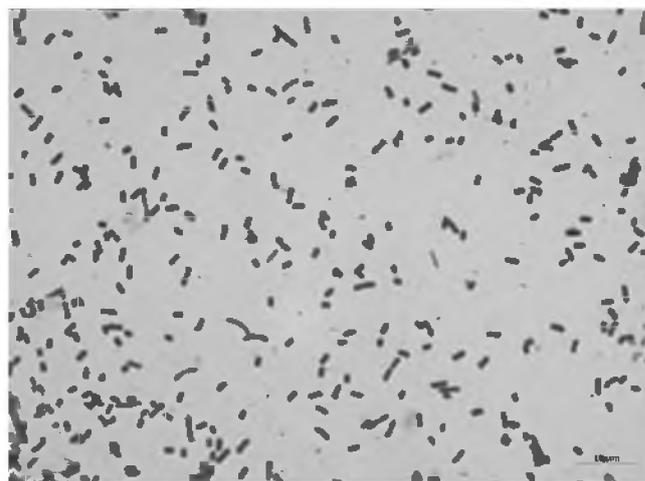
биоплёнка с мелкими клетками была зафиксирована у всех изученных изолятов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. marcescens* через 20 часов культивирования (рис. 3г, 4г, 5г). Спустя 24 часа от начала эксперимента на стационарной фазе роста биоплёночные структуры УПМ *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. marcescens* были частично разрушены, наблюдали остаточные скопления; наличие большого количества мелких одиночных клеток говорит о том, что начинается новый процесс образования микроколоний и многослойной структуры (рис. 3д, 4д, 5д). То есть в стадии стационарного роста отмечается сукцессия биоплёнки, когда некоторые сформированные клетки переходят во взвешенное состояние и вновь начинают образовывать на освободившемся месте микроколонии.

## ОБСУЖДЕНИЕ

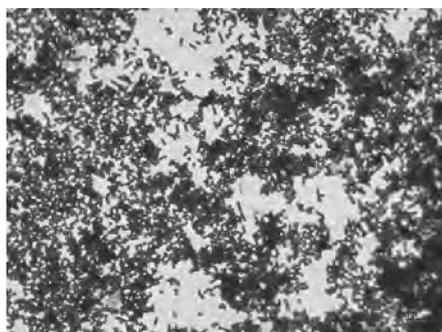
В клинической практике важно оценивать влияние дезинфицирующих средств и антисептиков не только на планктонные клетки, но и на разные стадии процесса формирования биоплёнки. При проведении экспе-



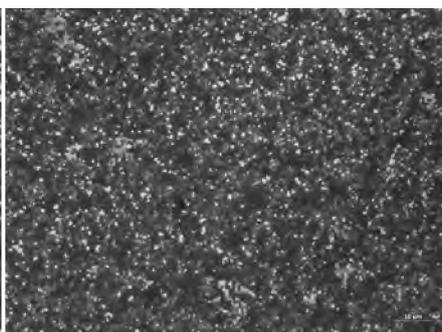
**а**



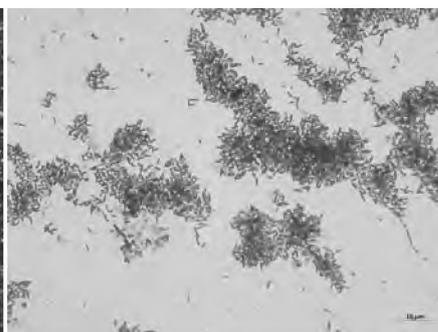
**б**



**в**



**г**



**д**

**РИС. 4.**

Динамика роста клеточной суспензии (**а**) и стадии биоплёнокообразования *K. pneumoniae* на абиотической поверхности: **б** – через 4 часа от начала эксперимента; **в** – через 8 часов; **г** – через 20 часов; **д** – через 24 часа

**FIG. 4.**

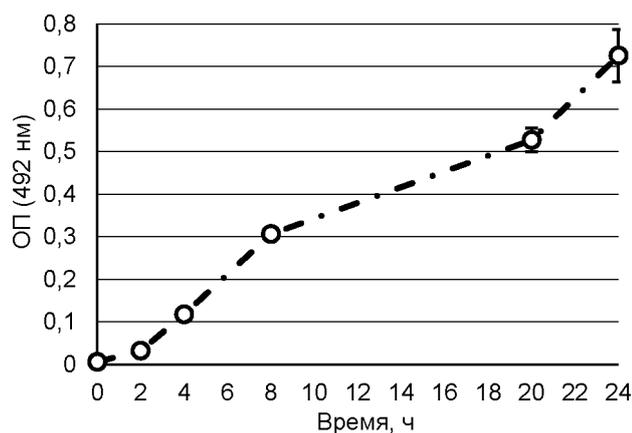
Dynamics of growth of cell suspension (**a**) and the stage of *K. pneumoniae* biofilm formation on the abiotic surface: **б** – 4 hours after the start of the experiment; **в** – after 8 hours; **г** – after 20 hours; **д** – after 24 hours

риментальных работ важно знать начальную концентрацию клеток, которая должна быть внесена на тестируемые поверхности для того, чтобы получить интенсивный рост биоплёночной структуры. При дальнейшем культивировании микробных клеток необходимо понимать, в какой промежуток времени поверхность будет освобождаться от той или иной части сформированной биоплёнки, для корректной оценки влияния дезинфицирующих средств непосредственно на сформированную биоплёнку, а не на биоплёночный консорциум в стадии сукцессии.

Данные литературы о временных стадиях формирования биоплёнки разноречивы, с указанием границ этого процесса от 24 часов до трёх суток. Так, Е.В. Осипова и соавт. (2014) полагают, что процессы формирования клеточных консорциумов происходят в основном в течение 48 часов [18]. В работе В.В. Леонова (2012) описывается, что стадии обратимой и необратимой микробной адгезии имеют продолжительность от 12 до 20 часов, а сформированную биоплёнку можно наблюдать уже через 24 часа культивирования изолятов [19]. А.В. Игнатенко (2008), оценивая влияние биоцидных препаратов на биоплёночные консорциу-

мы, показал, что необходимо использовать трёхсуточные культуры [20].

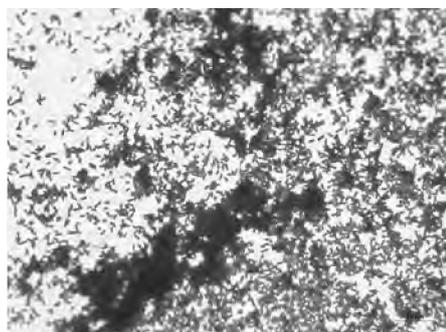
Наши исследования подтверждают, что клинически значимые штаммы микроорганизмов являются быстрорастущими, имеют высокую степень адгезии клеток и уже через 8 часов культивирования на абиотических поверхностях наблюдаются начальные стадии образования биоплёночных структур. Через 20 часов клетки формируют сплошную многослойную биоплёнку. По экспериментальным данным можно сделать вывод, что для того, чтобы адекватно оценивать влияние различных дезинфицирующих, антисептических и антимикробных средств на сформированную биоплёнку необходимо воздействовать на биоплёночный консорциум в течение первых суток. Выход бактерий из биоплёночного консорциума на микрофотографиях зафиксирован после 24 часов культивирования и подтверждается увеличением ОП планктонных культур. Это свидетельствует о том, что биоплёнка выходит на стадию сукцессии, в результате чего тестируемая поверхность частично освобождается от многослойной биоплёнки и дальнейшее воздействие различными антимикробными средствами может дать некорректный результат.



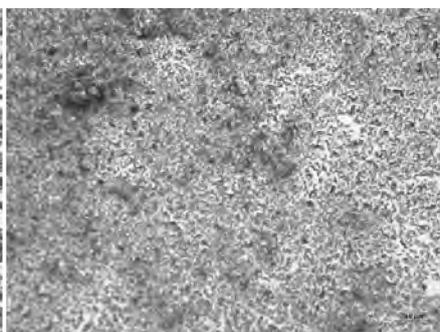
**а**



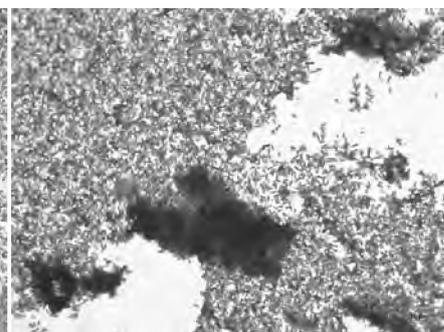
**б**



**в**



**г**



**д**

**РИС. 5.**

Динамика роста клеточной суспензии (**а**) и стадии биоплёнокообразования *S. marcescens* на абиотической поверхности: **б** – через 4 часа от начала эксперимента; **в** – через 8 часов; **г** – через 20 часов; **д** – через 24 часа

**FIG. 5.**

Dynamics of growth of cell suspension (**a**) and the stage of biofilm formation of *S. marcescens* on the abiotic surface: **б** – 4 hours after the start of the experiment; **в** – after 8 hours; **г** – after 20 hours; **д** – after 24 hours

Таким образом, продуктивный рост клеточной массы в первые часы культивирования способствует клинически значимым патогенам интенсивно заселять поверхности и образовывать биоплёночные структуры, что в свою очередь содействует приобретению клеточным консорциумом дополнительных свойств защиты от неблагоприятных для них факторов внешней среды.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Клинически значимые штаммы УПМ обладают продуктивным и быстрым ростом клеточных популяций, способны формировать многослойные биоплёночные консорциумы в течение 20 часов культивирования.

Полученные данные по временной продолжительности основных стадий кинетики роста в сопоставлении с визуализацией процесса формирования биоплёночных структур на абиотических поверхностях должны быть учтены при изучении воздействия дезинфицирующих, антисептических средств и антибактериальных лекарственных препаратов на планктонные клетки и био-

плёночные ассоциации клинически значимых условно-патогенных микроорганизмов.

**Конфликт интересов**

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial biofilm eradication agents: A current review. *Front Chem.* 2019; 7: 824. doi: 10.3389/fchem.2019.00824
- Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. Bacterial biofilm: Its composition, formation and role in human infections. *J Microbiol Biotechnol.* 2015; 4: 1-14.
- Pelling H, Nzakizwanayo J, Milo S, Denham EL, MacFarlane WM, Bock LJ, et al. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Lett Appl Microbiol.* 2019; 68(4): 277-293. doi: 10.1111/lam.13144
- Patini R, Staderini E, Lajolo C, Lopetuso L, Mohammed H, Rimondini L, et al. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018; 22: 5775-5788. doi: 10.26355/eurrev\_201809\_15903

5. Talapko J, Škrlec I. The principles, mechanisms, and benefits of unconventional agents in the treatment of biofilm infection. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13(10): 299. doi: 10.3390/ph13100299

6. Li Z, Knetsch M. Antibacterial strategies for wound dressing: Preventing infection and stimulating healing. *Curr Pharm Des*. 2018; 24(8): 936-951. doi: 10.2174/1381612824666180213141109

7. Xie T, Wu Q, Zhang J, Xu X, Cheng J. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from aquatic products and clinical by antibiotic susceptibility, virulence, and molecular characterisation. *Food Control*. 2017; 71: 315-321. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.046

8. Bjarnsholt T, Buhlin K, Dufrêne YF, Gomelsky M, Moroni A, Ramstedt M, et al. Biofilm formation – what we can learn from recent developments. *J Intern Med*. 2018; 284(4): 332-345. doi: 10.1111/joim.12782

9. Pannanusorn S, Ramirez-Zavala B, Lünsdorf H, Agerberth B, Morschhäuser J, Römling U. Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*. 2014; 13(4): 438-451. doi: 10.1128/EC.00181-13

10. Xu W, Dong S, Han Y, Li S, Liu Y. Hydrogels as antibacterial biomaterials. *Curr Pharm Des*. 2018; 24(8): 843-854. doi: 10.2174/1381612824666180213122953

11. Linnes JC, Ma H, Bryers JD. Giant extracellular matrix binding protein expression in staphylococcus epidermidis is regulated by biofilm formation and osmotic pressure. *Curr Microbiol*. 2013; 66(6): 627-633. doi: 10.1007/s00284-013-0316-7

12. Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology*. 2008; 56(3): 427-436. doi: 10.1007/s00248-007-9361-8

13. Kanwar I, Sah AK, Suresh PK. Biofilm-mediated antibiotic-resistant oral bacterial infections: Mechanism and combat strategies. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(14): 2084-2095. doi: 10.2174/1381612822666161124154549

14. Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Маркова Ю.А., Носкова О.А., и др. Моделирование бактериальных биоплёнок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(10): 652-658. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658

15. Григорова Е.В., Немченко У.М., Воропаева Н.М., Белькова Н.Л., Носкова О.А., Савилов Е.Д. Биоплёнообразование под воздействием дезинфицирующих средств с разным активным компонентом у *Pseudomonas aeruginosa*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 171(6): 733-738. doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-6-733-738

16. Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Немченко У.М., Носкова О.А., Чемезова Н.Н., Кунгурцева Е.А., и др. Способность к биоплёнообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2020; 1(79): 32-35. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35

17. Годовалов А.П., Степанов М.С., Кобзаренко Е.Е. *Способ оценки морфологической структуры биопленок микроорганизмов*: Патент № 2719402 Рос. Федерация; МПК G01N 33/483 (2006.01), C12Q 1/02 (2006.01); заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский уни-

верситет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России. № 2019145542; заявл. 30.12.2019; опубл. 17.04.2020; Бюл. № 11.

18. Осипова Е.В., Шипицына И.В., Науменко З.С. Сравнительная количественная оценка способности образования биоплёнки различными клиническими штаммами бактерий на поверхности полистирола стекла. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014; 8-1: 55-58.

19. Леонов В.В. Количественная оценка способности условно-патогенных микроорганизмов к образованию биоплёнки в эксперименте. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 10: 57-59.

20. Игнатенко А.В. Изучение образования биопленок бактерий и оценка их устойчивости к биоцидам. *Труды Белорусского Государственного Технологического университета. Химия и технология органических веществ*. 2008; 1(4): 173-176.

## REFERENCES

1. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial biofilm eradication agents: A current review. *Front Chem*. 2019; 7: 824. doi: 10.3389/fchem.2019.00824

2. Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. Bacterial biofilm: Its composition, formation and role in human infections. *J Microbiol Biotechnol*. 2015; 4: 1-14.

3. Pelling H, Nzakizwanayo J, Milo S, Denham EL, MacFarlane WM, Bock LJ, et al. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Lett Appl Microbiol*. 2019; 68(4): 277-293. doi: 10.1111/lam.13144

4. Patini R, Staderini E, Lajolo C, Lopetuso L, Mohammed H, Rimondini L, et al. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018; 22: 5775-5788. doi: 10.26355/eurev\_201809\_15903

5. Talapko J, Škrlec I. The principles, mechanisms, and benefits of unconventional agents in the treatment of biofilm infection. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13(10): 299. doi: 10.3390/ph13100299

6. Li Z, Knetsch M. Antibacterial strategies for wound dressing: Preventing infection and stimulating healing. *Curr Pharm Des*. 2018; 24(8): 936-951. doi: 10.2174/1381612824666180213141109

7. Xie T, Wu Q, Zhang J, Xu X, Cheng J. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from aquatic products and clinical by antibiotic susceptibility, virulence, and molecular characterisation. *Food Control*. 2017; 71: 315-321. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.046

8. Bjarnsholt T, Buhlin K, Dufrêne YF, Gomelsky M, Moroni A, Ramstedt M, et al. Biofilm formation – what we can learn from recent developments. *J Intern Med*. 2018; 284(4): 332-345. doi: 10.1111/joim.12782

9. Pannanusorn S, Ramirez-Zavala B, Lünsdorf H, Agerberth B, Morschhäuser J, Römling U. Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*. 2014; 13(4): 438-451. doi: 10.1128/EC.00181-13

10. Xu W, Dong S, Han Y, Li S, Liu Y. Hydrogels as antibacterial biomaterials. *Curr Pharm Des*. 2018; 24(8): 843-854. doi: 10.2174/1381612824666180213122953

11. Linnes JC, Ma H, Bryers JD. Giant extracellular matrix binding protein expression in staphylococcus epidermidis is regulated by biofilm formation and osmotic pressure. *Curr Microbiol*. 2013; 66(6): 627-633. doi: 10.1007/s00284-013-0316-7

12. Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology*. 2008; 56(3): 427-436. doi: 10.1007/s00248-007-9361-8
13. Kanwar I, Sah AK, Suresh PK. Biofilm-mediated antibiotic-resistant oral bacterial infections: Mechanism and combat strategies. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(14): 2084-2095. doi: 10.2174/1381612822666161124154549
14. Nemchenko UM, Kungurceva EA, Grigorova EV, Bel'kova NL, Markova YuA, Noskova OA, et al. Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020; 65(10): 652-658. (In Russ.). doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658
15. Grigorova EV, Nemchenko UM, Voropaeva NM, Bel'kova NL, Noskova OA, Savilov ED. Biofilm formation exposed to disinfectants with different active ingredients in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021; 171(6): 733-738. (In Russ.). doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-6-733-738
16. Savilov ED, Markova YuA, Nemchenko UM, Noskova OA, Chemezova NN, Kungurtseva EA, et al. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. *Pacific Medical Journal*. 2020; 1(79): 32-35. (In Russ.). doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35
17. Godovalov AP, Stepanov MC, Kobzareno EE. *Surviving as a community: Antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms*: Patent No. 2719402 of the Russian Federation. 2020; (11). (In Russ.).
18. Osipova EV, Shipicyna IV, Naumenko ZS. A comparative quantitative evaluation of the potential of biofilm formation by different bacterial clinical strains on polystyrene and glass surface. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2014; 8-1: 55-58. (In Russ.).
19. Leonov VV. The quantitative evaluation of capacity of opportunistic pathogenic microorganisms to form biofilms in experiment. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2012; 10: 57-59. (In Russ.).
20. Ignatenko AV. Study of bacterial biofilm formation and assessment of their resistance to biocides. *Trudy Belorusskogo Gosudarstvennogo Tekhnologicheskogo universiteta. Khimiya i tekhnologiya organicheskikh veshchestv*. 2008; 1(4): 173-176. (In Russ.).

#### Сведения об авторах

**Ситникова Ксения Олеговна** – лаборант-исследователь лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: butakovaksenia505@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7717-906X>

**Немченко Ульяна Михайловна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: umnemch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7656-342X>

**Воропаева Наталья Михайловна** – младший научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: n.m.shabanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7026-2522>

**Григорова Екатерина Владимировна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6588-2591>

**Савилов Евгений Дмитриевич** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: savilov47@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9217-6876>

**Маркова Юлия Александровна** – доктор биологических наук, заведующая лабораторией «Растительно-микробных взаимодействий», ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, e-mail: juliam06@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7767-4204>

**Белькова Наталья Леонидовна** – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nlbelkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9720-068X>

#### Information about the authors

**Kseniya O. Sitnikova** – Research Assistant at the Laboratory for Microecology and Microbiome, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: butakovaksenia505@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7717-906X>

**Ulyana M. Nemchenko** – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory for Microecology and Microbiome, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: umnemch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7656-342X>

**Natalia M. Voropaeva** – Junior Research Officer at the Laboratory for Microecology and Microbiome, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: n.m.shabanova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7026-2522>

**Ekaterina V. Grigorova** – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory for Microecology and Microbiome, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6588-2591>

**Eugeniy D. Savilov** – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; Chief Research Officer at the Laboratory of Epidemiologically and Socially Significant Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: savilov47@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9217-6876>

**Yuliya A. Markova** – Dr. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Laboratory of Plant-Microbial Interactions, Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants, e-mail: juliam06@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7767-4204>

**Natalia L. Belkova** – Cand. Sc. (Biol.), Docent, Leading Research Officer, Head of the Laboratory for Microecology and Microbiome, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: e-mail: nlbelkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9720-068X>

Статья опубликована в рамках V Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии».