

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології вірусології і біотехнології

Д и п л о м н а р о б о т а

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

на тему «Формування біоплівки *Pseudomonas sp.* виділених з морської
води за присутності синтетичних аналогів PQS»

i

Виконала: студентка заочної форми
навчання

Спеціальність 091 Біологія

Іванова Віра Дмитрівна

Науковий керівник:

Кандидат біологічних наук,
Галкін Миколай Борисович

Рецензент:

кандидат біологічних наук, доцент
Майкова Анна Вікторівна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри

№ _____ від «___» _____ р.

Завідувач кафедри
Філіпова Т. О.

Захищено на засіданні ЕК № 1
Протокол № _____ від «___»

Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК
Чеботар С. В.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Одеса – 2020

АНОТАЦІЯ

Робота присвячена дослідженню впливу синтетичних похідних PQS з різною довжиною алкільного ланцюга на формування біоплівки *Pseudomonas* аналогів PQS» викладено на 42 сторінках друкованого тексту, вона включає 12 рисунків та 1 таблицю. В роботі наведено посилання на 53 джерела літератури, з-поміж яких 8 кирилицею та 45 латиницею.

Ключові слова: синтетичні аналоги PQS, персистуючі клітини, штам *Pseudomonas aeruginosa* M2, штам *Pseudomonas aeruginosa* M1.

literature, including 8 in Cyrillic and 45 in Latin.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Загальна характеристика біоплівки	6
1.2. Особливості розвитку біоплівки бактерій роду <i>P. aeruginosa</i>	8
1.3. Захворювання викликані біоплівками.	10
1.4. Захворювання викликані біоплівками <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.5. Антибіотикорезистентність і клітини перстістери.....	14
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	19
2.1. Методи культивування та визначення маси біоплівки і вмісту планктонних та перситуючих клітин	19
2.2. Статистична обробка результатів дослідження.....	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	22
3.1. Вплив синтетичних похідних PQS на планктон штамів бактерій виду <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.2. Вплив синтетичних похідних PQS на формування біоплівки штамів бактерій виду <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.3. Вплив синтетичних похідних PQS на сформовані біоплівки штамів бактерій виду <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3.4. Вплив синтетичних похідних PQS на персистуючі клітини біоплівки штамів бактерій виду <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
4. УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	34
5. ВИСНОВКИ.....	36
6. СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	38

ВСТУП

На даний момент відомо, що у природніх умовах мікроорганізми існують переважно не поодинокі, а у вигляді досить складноорганізованих систем і співтовариств. Ці спільноти отримали назву біоплівки. Дослідження механізмів розвитку інфекційного процесу, включаючи утворення персистуючих форм мікроорганізмів, не можуть не враховувати наявності особливого біологічного явища - формування бактеріальних біоплівок.

На сьогоднішній день, в більшості випадків саме вони є причиною хронічних і рецидивуючих інфекцій. До 60% інфекцій (інфекції дихальних і сечовивідних шляхів, остеомієліт, ендокардити, інфекційні ускладнення при муковісцидозі, і ін.) викликані біоплівками [Blango, 2010; Kirov, 2011]. Одним із прикладів бактерії, яка викликає хронічні інфекції та має високу стійкість до антимікробних препаратів є *Pseudomonas aeruginosa*. Бактерії виду *P. aeruginosa* особливо легко вражає осіб з ослабленим імунним статусом. Величезну роль бактерія відіграє у гнійно-запальних ускладненнях операційних ран, опіків, які зводять нанівець лікування і часто призводять до летального наслідку. Тож надзвичайну актуальність на сьогодні має знаходження нових антимікробних препаратів.

Однією з найбільш вивчених є система QS у *P. aeruginosa*. Вона побудована за принципом аутоіндукції та складається з трьох пов'язаних між собою ланок – *las*-, *rhl*- та *pqs*-, в кожній з яких використовується своя сигнальна молекула [McKnight at al., 2008]. Серед цих сполук, важливе місце мають займати синтетичні аналоги 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону з різними замісниками [Soukarieh, at al., 2018].

Одним із головних факторів стійкості біоплівок до антибіотиків та антимікробних препаратів є персистуючі клітини. Ці клітини метаболічно не активні, толерантні до антибактеріальних препаратів, стійкі до коливань температури, кислотності середовища і інших стресових впливів. Таким чином, актуальним є пошук нових потенційних антимікробних препаратів, що здатні

уражати такі полірезистентні клітини, а також проявляти здатність протидіяти формуванню біоплівки, або руйнувати вже сформовані.

Виходячи з цього, **метою** даної роботи було дослідження впливу на сформовані біоплівки і персистуючі клітини штамів *P. aeruginosa* виділених з морської води оригінальних похідних PQS з різною довжиною алкільного ланцюга.

Для досягнення даної мети були поставлені наступні задачі:

1. Дослідити вплив синтетичних похідних PQS на ріст планктонної культури *P. aeruginosa*;
2. Дослідити вплив синтетичних похідних PQS на формування біоплівки *P. aeruginosa*;
3. Дослідити вплив синтетичних похідних PQS на сформовані біоплівки *P. aeruginosa*;
4. Дослідити вплив синтетичних похідних PQS на персистуючі клітини *P. aeruginosa*;

Об'єкт дослідження – структура та процес впливу синтетичних похідних PQS на ріст та формування біоплівки різними штамами виду *P. aeruginosa*;

Предмет дослідження – реакція різних штамів бактерій виду *P. aeruginosa* на синтетичні похідні хінолінових сполук під час формування колоній та біоплівки в залежності від довжини алкільного ланцюга хінолінової сполуки на особливостей штаму.

ВИСНОВКИ

1. Найбільш пригнічуючи дію на планктонну культуру *P. aeruginosa* із синтетичних похідних PQS мав іС3Q та С5Q. іС3Q дав зменшення планктону у штамі М1 на 16 %, а у штамі М2 на 19 %. С3Q виявив слабшу антибактеріальну дію у порівнянні із іС3Q, кількість клітин планктону майже не змінилась згідно контролю.

2. Дія С5Q сприяла зросту, найбільше підвищення маси простежується при концентрації 40 МкМ на 5 %. У штамі М2 при дії сполуки С5Q планктонна культура зменшилась на 18% у концентрації 80 %. В той час, як сполуки С8Q, С9Q та PQS дали збільшення росту планктонних клітин штаму М1. Найбільший рост планктонну спостирігався у PQS при концентації 20мкМ кількість збільшилась на 43%. Однак на штамі М2 сполуки с подовженим алкільним ланцюгом проявили себе протилежним чином – зниженням росту.

3. Найбільш стимулюючи дію на формування біоплівки *P. aeruginosa* штаму М1 надав синтетичний аналог С5Q, при концентрації 80 мкМ маса біоплівки збільшилась на 19,9 % у порівнянні із контролем. При додаванні сполук С3Q та іС3Q формування біоплівки штаму М1 залишилось практично незмінним або не суттєво більше контролю. Максимальне пригнічення формування біоплівки на штамі М2 дала сполука С3Q при концентрації 80 мкМ на 10 %. Сполуки PQS, С8Q, С9Q дали значне збільшення маси біоплівки штаму М1, при концентрації 80мкМ – 210%. Також ці сполуки, як і у випадку з планктоном на штамі М2 дали інгібуючу дію.

4. Сформовані біоплівки штаму М2 виявились біль чуттєвими до дії синтетичних похідних PQS, ніж біоплівки штаму М1. Найбільше зменшення маси біоплівки штаму М1 було спостережено при додаванні сполуки іС3Q у концентрації 20 мкМ – на 12. Найбільшу антибактеріальну на штамі М2 дію

виявила сполука C5Q, яка дала зменшення кількості біоплівки при всіх концентраціях, найбільшу – 33 % при концентрації 20 МкМ.

4. Вплив синтетичних похідних PQS сприяв зменшенню персистуючих клітин лише у штамі M1, але у штамі M2 навпаки стимулював їх зріст. Найбільше зменшення маси було спостережено при додаванні сполуки C3Q на 33 % у порівнянні із контролем. Найбільшу стимулюючу дію на штам M2 дала сполука C5Q, кількість персистуючих клітин збільшилась на 42 % при концентрації 80 мкМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афиногенова А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская. // Травматология и ортопедия России. – 2011. – №3. – С. 119–125.
2. Бережанский Б. В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока / Б. В. Бережанский, А. А. Жевнарев. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2006. – С. 130–144.
3. Гостев В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко. // Журнал инфектологии. – 2010. – №3. – С. 4–15.
4. Евдокимова Н. В. Персистирующие клетки микроорганизмов – новый взгляд на старую проблему / Н. В. Евдокимова, Т. В. Черненькая. // Клиническая микробиология антимикробных химикатов. – 2013. – №3. – С. 193–195.
5. Мальцев С. В. Что такое биопленка? [Электронный ресурс] / С. В. Мальцев, Г. Ш. Мансурова // Научно-практический медицинский журнал. Электронное издание. – 2011. – Режим доступа до ресурсу: <http://pmarchive.ru/chto-takoe-bioplenka>.
6. Механизмы формирования патогенности оппортунистическими микроорганизмами. // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – 2010. – №1. – С. 42– 43.
7. Окулич В. К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В. К. Окулич, А. А. Кабанова, Ф. В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с.
8. Честнова Т. В. Обзор методов борьбы с микробными биопленками при воспалительных заболеваниях [Электронный ресурс] / Т. В. Честнова, П. А. Хренов // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4102.pdf>.

9. Bjarnsholt T. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis / T. Bjarnsholt. // *Wound Repair Regen.* – 2008. – C. P. 2–10.
10. Blango M. G. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple anti-biotics / M. G. Blango, M. A. Mulvey. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2010. – C. P. 855–863.
11. Choong S. Biofilms and their role in infections in urology / S. Choong, H. Whitfield. // *BJU Int.* – 2000. – P. 935–941.
12. Christensen G. D. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices / G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. J. Younger. // *J. clin. microbiol.* – 1985. – C. P. 996–1006.
13. Costerton J. W. *The Biofilm Primer* / Jeremy Wilson Costerton. // Berlin: Springer. – 2007. – P. 200.
14. Durr T. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *E. coli* / T. Durr, M. Vellic, K. Lewis. // *PloS Biology.* – 2010. – P. 1–8.
15. Effects on quinolone resistance due to the biofilm formation activity in *Ureaplasma urealyticum* / C. Feng, Y. Hung, D. Duan, Y. Dai. // *Turk J Med Sci.* – 2015. – P. 9– 55.
16. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis / L. R. Mulcahy, J. L. Burns, S. Lory, K. Lewis. // *J Bacteriol.* – 2010. – P. 61–91.
17. Evans L. Characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* / L. Evans, L. Production. // *Journal of Bacteriology.* – 1997. – №116. – C. 915–924.
18. Gellatly S. L. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. / S. L. Gellatly, R. E. Hancock. // *Path. Dis.* – 2013. – №67. – C. 159–173.
19. Ghafoor A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture / A. Ghafoor, I. Hay, B. Rehm. // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2011. – №77. – C. 5238–5246.

20. Gloag E. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA / E. Gloag, L. Turnbull, A. Huang. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – №110. – C. 3803–3815.
21. Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections / Leroy Hall-Stoodley. // 2009. – P. 1034–1043.
22. Häussler S S. New perspectives at the heart of surface-associated microbial communities / S. Häussler S, M. Parsek MR. // *Journal of Bacteriology*. – 2010. – №192. – C. 2941–2949.
23. Hentzer M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors / M. Hentzer, H. Wu, J. Andersen. // *EMBO Journal*. – 2003. – №22. – C. 3803–3815.
24. Hibbing M. E. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle / Mark Edward Hibbing. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – P. 15–25.
25. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure / S. Periasamy, H. S. Joo, A. C. Duong, T. H. Bach. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2012. – P. 6–126.
26. James G. E. Biofilms in chronic wounds / Gallahard Edward James. // *Wound Repair Regen.* – 2008. – P. 37–44.
27. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon / Rode Jayaraman. // *J Biosci.* – 2008. – P. 795–805.
28. Keren I. Persister cells and tolerance to antimicrobials / Izrael Keren. // *FEMS Microb. Let.* – 2004. – P. 13–18.
29. Kirow S. B. Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis / Sergey Borisovich Kirow. // *Microbiology*. – 2007. – P. 3264–3274.
30. Kreft J. U. Biofilms promote altruism / Johann Ung Kreft. // *Microbiology*. – 2000. – P. 2751–2760.
31. Lasa I. Bap, a family of surface proteins involved in biofilm formation / Iona Lasa. // *Res. Microbiol.* – 2005. – P. 99–107.

32. Lawrence R. M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease / R. M. Lawrence, M. I. Vincent, K. Lewis. // *Microb Ecol.* – 2013. – №68. – C. 1–12.
33. Lewic K. Persister cells / Kemmel Lewic. // *Annu Rev Microbiol.* – 2010. – P.357–72.
34. McKnight S. L. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* / S. L. McKnight, B. L. Iglewski, E. C. Pesci. // *J. Bact.* – 2000. – №182. – C. 2702–2708.
35. Metha P. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes / Powell Metha. // *Mol. Microbiol.* – 2006. – P. 839–846.
36. Mo`ker N. *Pseudomonas aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Per-sister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling / Nicholas Mo`ker. // *J. of Bact.* – 2010. – P. 1946–1955.
37. Moons P. Bacterial interactions in biofilms / Peter Moons. // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2009. – P. 157–168.
38. Mulcahy H. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / H. Mulcahy, L. Charron-Mazenod, S. Lewenza. // *PLoS Pathogens.* – 2008. – №4. – C. 89–102.
39. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology.* 2015;41(3):341-352
40. Pace J. L. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy* / Jeremy Louis Pace. // Taylor & Francis Group. – 2006. – P. 495.
41. Raad I. Intravascular catheters impregnated with antimicrobial agents: a milestone in the prevention of bloodstream infections / I. Raad, H. Hanna. // *Nov.* – 1999. – №7. – C. 386–90.
42. Rajan S. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis / S. Rajan, L. Saiman. // *Semin. Respir. Infect.* – 2002. – №17. – C. 47–56
43. Rasamiravaka T., Labtani Q., Duez P. / The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds

- interfering with control mechanisms // BioMed Research International. – 2015. – №1. – C. 1–51.
44. Römling U. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system / U. Römling, M. Gomelsky, N. L. Galperin. // Microbiology. – 2005. – №57. – C. 629–639.
 45. Simmons W. L. A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis* / William Louis Simmons. // J. Bacteriol. – 2007. – P. 1905–1913.
 46. Somanathan R. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids J. heterocycl / R. Somanathan, K. M. Smith. // Chem. – 1981. – №18. – C. 1077–1079.
 47. Soukarieh F. In Silico and in Vitro-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* / F. Soukarieh, E. W. Oton, J. Dubern. // Molecules. – 2018. – №23. – C. 257–272.
 48. Spoering A. L. K. GlpD and Pls participate in persister cell formation in *Escherichia coli* / A. L. Spoering, M. Vulic, K. Lewis. // J Bacteriol. – 2006. – P. 44–136.
 49. Swartjes J. A functional DNase coating to prevent adhesion of bacteria and the formation of biofilm / J. Swartjes, T. Das, S. Sharifi. // Advanced Functional Materials. – 2013. – №68. – C. 1–12.
 50. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* / P. Jimenez, J. Koch, K. Thompson, P. Xavier. // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2012. – №76. – C. 46–65.
 51. Turkina M. Bacteria-host crosstalk: Sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections / M. Turkina, E. Vikström. // Journal of Innate Immunity. – 2019. – №11. – C. 263–279.
 52. Warren J. W. Catheter-associated urinary tract infections / James Williams Warren. // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2001. – P. 299–303.
 53. Williams P. Quorum sensing, communication and crosskingdom signalling in the bacterial world / Peters Williams. // Microbiology. – 2007. – P. 3923–3938.