

## ВЛИЯНИЕ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЖИДКОЙ СИНТЕТИЧЕСКОЙ СРЕДЕ СТИМУЛИРУЮЩЕЙ ОБРАЗОВАНИЕ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА

Малинов Е.С.<sup>1</sup>, Шестаков А.Г.<sup>1</sup>, Семёнов А.М.<sup>2</sup>, Молофеева Н.И.<sup>1</sup>, Пульчеровская Л.П.<sup>1</sup>, Карамышева Н.Н.<sup>1</sup>, Сверкалова Д.Г.<sup>1</sup>, Батраков В.В.<sup>3</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия (432017, Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1), e-mail: [jenek-malinin@rambler.ru](mailto:jenek-malinin@rambler.ru)

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия (119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1)

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», Ульяновск, Россия (432700, Ульяновск, площадь 100-летия со дня рождения В.И. Ленина, 4)

Проведены исследования возможности различных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* формировать экзополимерный матрикс на жидкой синтетической среде в присутствии нитрата калия и нитрата натрия, а так же нитрита натрия в аэробных и анаэробных условиях. В ходе проведения эксперимента нами было использовано 5 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Культивирование бактерий *Pseudomonas aeruginosa* осуществляли в жидкой синтетической среде, в которой заменили включенный в состав среды L-аргинин нитратом калия, затем нитратом натрия, и далее нитритом натрия. Культивирование проводили в термостате в течении 120 часов при 37°C. Культивирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa* проводили в пробирках в аэробных и анаэробных условиях. В результате эксперимента выяснили, что штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, за исключением №128 способны формировать экзополимерный матрикс в аэробных условиях на жидкой синтетической среде в присутствии нитрата калия и нитрата натрия, а также нитрита натрия. В анаэробных условиях эта способность у них отсутствует.

Ключевые слова: экзополимерный матрикс, жидкая синтетическая среда, *Pseudomonas aeruginosa*.

## INFLUENCE ON NITRATES AND NITRITES BIOFILM FORMATION STRAINS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WHEN CULTURED ON A LIQUID SYNTHETIC MEDIUM STIMULATES THE FORMATION EXOPOLYMERIC MATRIX

Malinov E.S.<sup>1</sup>, Shestakov A.G.<sup>1</sup>, Semjonov A.M.<sup>2</sup>, Molofeeva N.I.<sup>1</sup>, Pulcherovskaja L.P.<sup>1</sup>, Karamysheva N.N.<sup>1</sup>, Sverkalova D.G.<sup>1</sup>, Batrakov V.V.<sup>3</sup>, Vasilev D.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy. a. P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russia (432017, Ulyanovsk, boulevard Novyj Venec, 1), e-mail: [jenek-malinin@rambler.ru](mailto:jenek-malinin@rambler.ru)

<sup>2</sup>Moscow State University a. M.V. Lomonosov, Moscow, Russia (119991, Moscow, street Leninskie gory, 1)

<sup>3</sup>Ulyanovsk State Pedagogical University a. I.N. Ulyanov, Ulyanovsk, Russia (432700, Ulyanovsk, square 100-letija so dnja rozhdenija V.I. Lenina, 4)

Studied the possibility of different strains of *Pseudomonas aeruginosa* exopolymeric matrix form on synthetic liquid medium in the presence of potassium nitrate and sodium nitrate, as well as sodium nitrite, under aerobic and anaerobic conditions. During the experiment, we used 5 strains *Pseudomonas aeruginosa*. Cultivation of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* was performed in a liquid synthetic medium, which was replaced included in the composition of the medium L-arginine, potassium nitrate, sodium nitrate, and then, further with sodium nitrite. Cultivation was performed in an oven for 120 hours at 37C. The cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* strains was performed in tubes in both aerobic and anaerobic conditions. The experiment found that strains of *Pseudomonas aeruginosa*, except №128 capable of forming a exopolymeric matrix under aerobic conditions in a liquid synthetic medium in the presence of potassium nitrate and sodium nitrate and sodium nitrite. Under anaerobic conditions, this ability they lack.

Keywords: exopolymeric matrix, liquid synthetic medium, *Pseudomonas aeruginosa*

Биопленка — сообщество микроорганизмов, которые прикреплены к поверхности какого либо тела или друг к другу, заключенные в экзополимерный матрикс,

синтезированный ими внеклеточными полимерными веществами, имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессией специфичных генов [7]. Формирование сообщества микроорганизмов в виде биопленки в последующем завершается образованием экзополимерного матрикса – продукта жизнедеятельности самих клеток, основного структурного компонента биопленки, покрывающего ее поверхность и обеспечивающего защиту от неблагоприятных воздействий. Экзополисахариды составляют значительную часть экзополимерного матрикса – 85% массы биопленки. Таким образом, бактерии в биопленке заключены в полимерный матрикс, свойства которого определяют взаимоотношения внутри клеточного сообщества и с внешней средой [5]. *Pseudomonas aeruginosa* в биопленках обильно синтезирует свой полисахарид альгинат [6]. На основании полученных нами ранее данных бактерии *Pseudomonas aeruginosa* способны расти на жидкой синтетической среде с сукцинатом натрия с признаками зрелой биопленки с образованием альгинатов [2, 3, 4]. Нами было показано влияние L-аргинина на образование экзополимерного матрикса у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Целью настоящего исследования являлось изучение возможности различных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* формировать экзополимерный матрикс на жидкой синтетической среде в присутствии нитрата калия и нитрата натрия, а так же нитрита натрия в аэробных и анаэробных условиях. В ходе проведения эксперимента нами было использовано 5 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (№22; №52; №444; №М10; №128), полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина. В эксперименте использовалась синтетическая среда содержащая: хлорид натрия, сульфат магния, калий фосфорнокислый однозамещенный и двухзамещенный, сукцинат натрия и L-аргинин в количестве 2,0 г/л. Исследуемые штаммы вносили в жидкую синтетическую среду, замещая включение в состав среды L-аргинина нитратом калия, затем нитратом натрия, и далее нитритом натрия. Нитраты и нитриты указанных металлов, при замещении L-аргинина, вносили в количестве 2,0 г/л. Культивирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa* проводили в пробирках в аэробных и анаэробных условиях. Для создания анаэробных условий использовали способ снижения парциального давления кислорода охлаждением и добавлением вазелинового масла.

В качестве контроля использовали интактные пробирки с указанной выше средой. После внесения бактериальной культуры пробирки помещали в термостат на 120 часов при 37°C. По истечении указанного срока, проводили учет результатов (таб. 1, 2, 3).

Таблица 1

Показатели формирования экзополимерного матрикса штаммов *Pseudomonas aeruginosa* на жидкой синтетической среде с нитратом калия (KNO<sub>3</sub>)

штамм №	аэробные условия			анаэробные условия		
	пигментация	вязкость	экзополимерный матрикс	пигментация	вязкость	экзополимерный матрикс
128	+	+	+	-	-	-
52	+	+	+	-	-	-
22	-	+	+	-	-	-
444	+	+	+	-	-	-
M10	-	+	+	-	-	-
контроль	-	-	-	-	-	-

Таблица 2

Показатели формирования экзополимерного матрикса штаммов *Pseudomonas aeruginosa* на жидкой синтетической среде с нитратом натрия ( $\text{NaNO}_3$ )

штамм №	аэробные условия			анаэробные условия		
	пигментация	вязкость	экзополимерный матрикс	пигментация	вязкость	экзополимерный матрикс
128	-	-	-	-	-	-
52	-	+	+	-	-	-
22	-	+	+	-	-	-
444	+	+	+	-	-	-
M10	-	+	+	-	-	-
контроль	-	-	-	-	-	-

Таблица 3

Показатели формирования экзополимерного матрикса штаммов *Pseudomonas aeruginosa* на жидкой синтетической среде с нитритом натрия ( $\text{NaNO}_2$ )

штамм №	аэробные условия			анаэробные условия		
	пигментация	вязкость	экзополимерный матрикс	пигментация	вязкость	экзополимерный матрикс
128	-	-	-	-	-	-
52	-	+	+	-	-	-
22	-	+	+	-	-	-
444	+	+	+	-	-	-
M10	-	+	+	-	-	-
контроль	-	-	-	-	-	-

Как видно из указанной выше таблицы 1 все штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в аэробных условиях образуют вязкость и экзополимерный матрикс в виде светло-желтого сгустка в жидкой синтетической среде с нитратом калия, а пигментацию проявляют только три штамма (№128, №52 и №444). В анаэробных условиях процесса формирования биопленки не наблюдали. По данным из таблицы 2 и 3 показано, что штаммы в анаэробных условиях в

жидкой синтетической среде в присутствии нитрата и нитрита натрия так же не проявляют ни каких признаков формирования биопленки. В аэробных условиях только штамм №444 дает пигментацию в среде и проявляет все вышеуказанные признаки формирования биопленки, а штамм №128 их не проявляет. Штаммы №52, №22 и №М10 проявляют признаки формирования экзополимерного матрикса биопленки, за исключением пигментации среды.

#### **Выводы:**

1. Штаммы бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, за исключением № 128, способны к образованию экзополимерного матрикса в аэробных условиях в жидкой синтетической среде с сукцинатом в присутствии нитрата калия, нитрата натрия или нитрита натрия.
2. Штаммы бактерии *Pseudomonas aeruginosa* не способны к образованию экзополимерного матрикса в анаэробных условиях в жидкой синтетической среде с сукцинатом в присутствии нитрата калия, нитрата натрия или нитрита натрия.

#### **Список литературы**

1. Батраков В.В. Влияние L-аргинина на формирование внеклеточного полимерного матрикса бактериями *Pseudomonas aeruginosa* / В.В. Батраков, А.Г. Шестаков, Е.С. Малинов, Д.А. Васильев // Ульяновск: XXVIII ЛЮБИЦЕВСКИЕ ЧТЕНИЯ: Современные проблемы эволюции и экологии, 2014. - стр. 266-268.
2. Малинов Е.С. Бактериальные биопленки и методы их получения / Е.С. Малинов, А.Г. Шестаков, Д.А. Васильев // Саратов: Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве, 2012. – 202 с.
3. Малинов Е.С. Влияние уксуснокислого свинца на планктонные и биопленочные формы *Pseudomonas aeruginosa* / Е.С. Малинов, А.Г. Шестаков, Д.А. Васильев // Владимир: Ветеринария и кормление, 2012. - №5. – стр. 28-30.
4. Шестаков А. Г. Среда для стимуляции образования биопленок у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Москва: НАУЧНАЯ ЖИЗНЬ, 2011. - №5. - стр. 22-27.
5. Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // J. Bacteriol. 2001. Vol. 138. P. 5395–5401.
6. Oglesby L. L. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization / Lashanda L. Oglesby, [et. al.] // Microbiology. – 2008. – №154. – P. 1605–1615.
7. Tetz V.V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. Med Microbiol. Lett., 1996; 5:426-36.

**Рецензенты:**

Золотухин С.Н., д.б.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина», г.Ульяновск.

Нафеев А.А., д.м.н., заведующий отделом особо опасных инфекций, природно-очаговых инфекций и профилактики туберкулеза, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», г.Ульяновск.