

ВСЕРОССИЙСКАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ ПО ЭКОЛОГИИ
РЕГИОНАЛЬНЫЙ ЭТАП - 2019 ГОД
11 КЛАСС

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ТУР

Таблица заполняется жюри

№ задания	Балл	Проверил	Балл	Проверил	Итого
1	3	<i>[Signature]</i>	3	Bh	3
2	4	<i>[Signature]</i>	4	Bh	4
3	6	<i>[Signature]</i>	6	Bh	6
4	3	<i>[Signature]</i>	3	Bh	3
5	6	<i>[Signature]</i>	6	Bh	6
6	4	<i>[Signature]</i>	4	Bh	4
7	4	<i>[Signature]</i>	4	Bh	4
8	6	<i>[Signature]</i>	6	Bh	6
9	1	<i>[Signature]</i>	1	Bh	1
10	4	<i>[Signature]</i>	4	Bh	4
11	2	<i>[Signature]</i>	2	Bh	2
12	0	<i>[Signature]</i>	0	Bh	0
13	4	<i>[Signature]</i>	4	Bh	4
14	4	<i>[Signature]</i>	4	Bh	4
15	6	<i>[Signature]</i>	6	Bh	6
16	3	<i>[Signature]</i>	3	Bh	3

60

ШИФР

э	1	1	0	7
---	---	---	---	---

Уважаемый участник! Перед выполнением конкурсной работы заполните аккуратно и разборчиво, без помарок и зачёркиваний

ЛИНИЯ ОТРЕЗА ✂

Внимание!

Оценивание работ конкурсантов производится **ЦЕЛЫМИ** числами. Дробные числа для оценивания работ как теоретического, так и проектного туров **НЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ**.

Максимальное количество баллов за сообщение - 18

Всего количество баллов за проектный тур - 38

ФИО Косарева Оксана

Территория, ОО: г. Пермь, МАОУ "Лицей №2"

Название работы: Изучение влияния поглазенок на переход бактерий от планктонного образа жизни к формированию биоплёнок

шкала оценки сообщений

Показатели		Градации	Баллы
выступление	1. Соответствие сообщения заявленной теме, цели и задачам проекта	соответствует полностью	2
		есть несоответствия (отступления)	1
		в основном не соответствует	0
	2. Структурированность (организация) сообщения, которая обеспечивает понимание его содержания	структурировано, обеспечивает	2
		структурировано, не обеспечивает	1
		не структурировано, не обеспечивает	0
	3. Культура выступления - чтение с листа или рассказ, обращённый к аудитории	рассказ без обращения к тексту	2
		рассказ с обращением к тексту	1
		чтение с листа	0
	4. Доступность сообщения о содержании проекта, его целях, задачах, методах и результатах	доступно без уточняющих	2
		доступно с уточняющими вопросами	1
		недоступно с уточняющими	0
5. Целесообразность, инструментальность наглядности, уровень её использования	целесообразна	2	
	целесообразность сомнительна	1	
	не целесообразна	0	
6. Соблюдение временного регламента сообщения (не более 7 минут)	соблюдён (не превышен)	2	
	превышение без замечания	1	
	превышение с замечанием	0	
дискуссия	7. Чёткость и полнота ответов на дополнительные вопросы по существу сообщения	все ответы чёткие, полные	2
		некоторые ответы нечёткие	1
		все ответы нечёткие/неполные	0
	8. Владение специальной терминологией по теме проекта, использованной в сообщении	владеет свободно	2
		иногда был неточен, ошибался	1
		не владеет	0
9. Культура дискуссии - умение понять собеседника и аргументировано ответить на его вопросы	ответил на все вопросы	2	
	ответил на большую часть вопросов	1	
	не ответил на большую часть вопросов	0	

17

Всего баллов: 35

Проверил: Александр Александрович

Внимание! Оценивание работ конкурсантов производится ЦЕЛЫМИ числами. Дробные числа для оценивания работ как теоретического, так и проектного туров НЕ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ.


Максимальное количество баллов за рукопись проекта - 20

<i>шкала оценки рукописи проекта</i>		
<i>Показатели</i>	<i>Градация Баллы ^</i>	
1. <i>Обоснованность и актуальность темы проекта - целесообразность аргументов, подтверждающих актуальность темы проекта</i>	обоснована; аргументы целесообразны	2
	обоснована; целесообразна часть	1
	не обоснована, аргументы отсутствуют	0
2. <i>Конкретность, ясность формулировки цели, задач, а также их соответствие теме проекта</i>	конкретны, ясны, соответствуют	2
	неконкретны, неясны или не соответствуют	1
	цель и задачи не поставлены	0
	явно нецелесообразна или отсутствует	0
3. <i>Теоретическая значимость обзора - представлена и обоснована модель объекта, показаны её недостатки</i>	модель полная и обоснованная	2
	модель неполная и слабо обоснованная	1
	модель объекта отсутствует	0
4. <i>Значимость работы для оценки возможного экологического риска в рассматриваемой области</i>	приведена оценка экологического риска	2
	оценка экологического риска частична	1
	нет оценки экологического риска	0
5. <i>Значимость работы для снижения возможного экологического риска в рассматриваемой области</i>	предлагаются мероприятия для снижения	2
	снижение риска рассматриваются фрагментарно	1
	снижение риска не рассматривается	0
6. <i>Обоснованность методик доказана логически и/или ссылкой на авторитеты и/или приведением фактов</i>	применение методик обосновано	2
	методики обоснованы не достаточно	1
	методики не обоснованы	0
7. <i>Наглядность (многообразие способов) представления результатов - графики, гистограммы, схемы, фото</i>	использованы все возможные способы	2
	использована часть способов	1
	использован только один способ	0
8. <i>Дискуссионность (полемичность) обсуждения полученных результатов с разных точек зрения, позиций</i>	приводятся и обсуждаются разные позиции	2
	разные позиции приводятся без обсуждения	1
	приводится и обсуждается одна позиция	0
9. <i>Соответствие содержания выводов содержанию цели и задач</i>	соответствуют; гипотеза оценивается	2
	частично; гипотеза только упоминается	1
	не соответствуют; гипотеза не оценивается	0
10. <i>Оформление рукописи (введение, лит. обзор, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, литература)</i>	грамотно структурирована (все разделы)	2
	имеются не все разделы, неуд.список лит-	1
	оформлена небрежно	0

Задание 1

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 6 баллов.

2. Как соотносится экология с естественными науками? Экология изучает взаимоотношения организмов и их связь со средой обитания. Экология является одной из естественных наук и во многом пересекается с биологией, географией, химией.
1. В естественных условиях в экосистеме есть ^{биологические} механизмы, посредством которых осуществляется регуляция численности вида (хищники, паразиты, конкуренция). А также условия среды часто отклоняются от оптимальных.
3. Но помимо того, что экология наука естественная, она связана с науками социальными. Т.к. одним из объектов изучения экологии является человек (пр. раздел демография), а человек существо био-социальное.


Балл:	3 3	Проверил:	
-------	-----	-----------	--

Задание 2

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1. В естественных условиях в экосистеме есть биологические механизмы, посредством которых осуществляется регуляция численности вида (влияние хищников, паразитов, межвидовая и внутривидовая конкуренция). Также условия среды часто отклонены от оптимальных.
2. При введении в экосистему новых видов и их успешной акклиматизации может произойти увеличение численности этого

вида, т.к. биологические механизмы регуляции численности для этого вида нет. (Пр: нет хищников и конкуренции), Пример - кролики в Австралии.

Балл:	4 4	Проверил:	В.Н. 
-------	-----	-----------	--

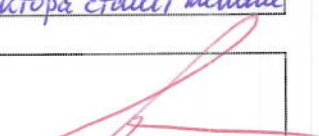
Задание 3

Приведите два положения. За положение от 0 до 2 баллов. Ответьте на вопрос. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 6 баллов.

1. При воздействии неблагоприятного фактора вид, если есть возможность, будет уходить на новые территории, где действие этого фактора будет минимально и где вид сможет существовать. Стратегия расселения.


2. Если уход на новые территории невозможен, то виду остается приспособляться к новым условиям. При этом действует естественный отбор - часть особей ~~будет~~ погибнет, а выживут и оставят потомство более приспособленные.

3. Линия оптимальная в процессе эволюции возможна. Если вид подвергается влиянию движущего естественного отбора, то оптимальная может сместиться в сторону крайних значений фактора. Если отбор стабилизирующий ^{оптимальный} фактора ^{становит меньше}

Балл:	6 6	Проверил:	В.Н. 
-------	-----	-----------	--

Задание 4

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1.	При увеличении численности популяции увеличится внешнее воздействие, способствующее снижению этой численности. Возрастет число хищников; из-за сокращения кормовой базы ↑ конкуренция; легче будут распространяться инфекции и паразиты; снизится плодородность.
2.	При снижении численности популяции гомеостатические механизмы будут возвращать ее к норме. Снизится внешнее воздействие со стороны хищников (т.к. сократ. их численность), снизится межвидовая и внутривидовая конкуренция, ↑ плодородность.
Балл:	3 3
Проверил:	Bh 

Задание 5

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 8 баллов.

1.	Фенологическим признаком можно считать несоответствие наступлений времени года с увелишением длины светового дня.
2.	Изменение климата на Земле, связанное с увеличением хозяйственной деятельности человека. И др. антропогенными процессами.
3.	Изменяется число природных экосистем, происходит исчезновение многих видов ⇒ ↓ биоразнообразия. Экосистемы становятся менее устойчивыми.

4. Причины фенологических сдвигов связаны непосредственно с деятельностью человека, поэтому, чтобы сократить вредные последствия нужно заранее соотносить, как отразится на природе деятельность предприятия и др.


Балл:	6 6	Проверил:	Вн 
-------	-----	-----------	--

Задание 6

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1. Более узкая экологическая ниша подразумевает большую специализацию вида. Нр, питающиеся определенными частями растения, обитающие на определенной яруссе (только). Узкая экон. ниша снижает конкуренцию между видами, но при изменении условий вид может исчезнуть.

2. Более широкая экологическая ниша свойственна ^{видам} ~~органам~~, приспособленным к широкому спектру факторов среды (питаются различной пищей, разные местообитания), но виды с широкой экологической нишей сталкиваются с большей конкуренцией с др. видами.


Балл:	4 4	Проверил:	Вн 
-------	-----	-----------	---

ВСЕРОССИЙСКАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ ПО ЭКОЛОГИИ
РЕГИОНАЛЬНЫЙ ЭТАП - 2019 ГОД Э-11-07
11 КЛАСС

Задание 7

Ответьте на вопрос. За вариант от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1. Если два близких вида оказываются на одной территории, то один вид (более многочисленный или приспособленный) может вытеснить другой с этой территории. Сокращением численности более "слабого" вида.
2. Возможно течение разделение ареала между этими видами (если среди них нет доминирующего), разделение времени активности или разделение экологических ~~ниш~~^{ниш} (при этом возможна специализация).

Балл:	4 4	Проверил:	B.H. 
-------	-----	-----------	---


Задание 8

Ответьте на вопрос и приведите три условия. За ответ на вопрос и каждое положение от 0 до 2 баллов. Всего за задание 8 баллов.

1. Искусственное увеличение численности вида сложно, т.к. в экосистеме любой вид взаимосвязан с другими. На этот вид действуют не только физические, но и биологические механизмы регулирующие его численность.
2. Создание оптимальных условий среды для вида, при которых он может существовать и размножаться. Например кормовой базы, мест укрытия, водоема и т.п.
3. Сокращение числа биологических факторов неблагоприятно влияющих на численность вида (например хищники).

нов, но в разных границах). Сокращение действия неблагоприятного антропогенного фактора.

4. Регуляция численности в самитарных целях (исключе-
ние из популяции больных и старых особей, особей с пове-
дическими, морфологическими отклонениями) посредством
искусственного или естественного (те же хищники) отбора.

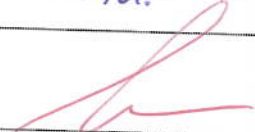
Балл:	6 6	Проверил:	Bh 
-------	-----	-----------	---

Задание 9

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1. На ранних этапах развития жизни из-за большой доступ-
ности органического вещества хемосинтетиков и фотосин-
тетиков еще не было. С сокращением органики в среде
появилась необходимость ее производства.

2. На более поздних этапах развития Земли, когда
уже появились фото и хемосинтетики происходят
их дальнейшая эволюция. Хемотрофные организмы - в
основном бактерии. ~~Фототрофные~~ Фототрофные как про, так и эукари
оты.

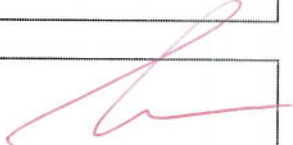
Балл:	1 1	Проверил:	Bh 
-------	-----	-----------	--

ВСЕРОССИЙСКАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ ПО ЭКОЛОГИИ
РЕГИОНАЛЬНЫЙ ЭТАП - 2019 ГОД
11 КЛАСС

Задание 10

Ответьте на вопрос. Приведите три положения. За положение от 0 до 2 баллов. Всего за задание 6 баллов.

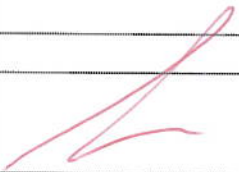
1. ~~Большая часть видов растений и животных~~ Исчезнут болотные виды растений и животных \Rightarrow сократится численность др. организмов, которые ранее с ними взаимодействовали (симбиотические отношения, хищничество и т.д).
2. Исчезнет экотон по границе болота и другой экосистемы. А в экотоне биологическое разнообразие наиболее высоко, значит, в масштабах еще более крупной экосистемы снизится стабильность.
3. После осушения останутся крупные залежи торфа, что повысит риск возникновения в этой же местности лесных/степных пожаров, в том числе повешных.

Балл:	4 4	Проверил:	Bh 
-------	-----	-----------	--

Задание 11

Ответьте на вопрос. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 2 балла.

Белые медведи и тигры являются крупными хищниками, консументами II (иногда III) порядка в данных экосистемах. Если их популяция стабильна, значит, на предыдущих трофических уровнях все в порядке.

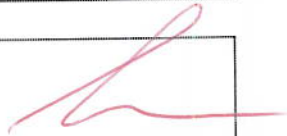
Балл:	2 2	Проверил:	Bh 
-------	-----	-----------	--

ВСЕРОССИЙСКАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ ПО ЭКОЛОГИИ
РЕГИОНАЛЬНЫЙ ЭТАП - 2019 ГОД
11 КЛАСС

Задание 12

Приведите два положения. За положение от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1.	При продвижении от экватора к полюсам биоразнообразие уменьшается. Но в зоне умеренного пояса (поперечные) остается наиболее наиболее крупными (полями).
2.	—


Балл:	0 0	Проверил:	B/h 
-------	-----	-----------	---

Задание 13

Приведите два положения. За положение от 0 до 2 баллов. Ответьте на вопрос. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 6 баллов.

1.	В этих районах благоприятные условия среды для жизни многих организмов. Оптимальные температуры, влажность, продолжительный световой день, доступность необходимых питательных веществ и биоэлементов.
2.	В этих районах минимизируется минимизируется или только разрушающее среду действие человека (хозяйственная деятельность). Нет шумового, газового, радиационного загрязнения. А также минимальная конкуренция с др. видами.

3. В центральной Сибири широкое биоразнообразие из-за суровых климатических условий, бедных почв, участков с вечной мерзлотой, в следствие этого, ~~идет~~ малая кормовая база.

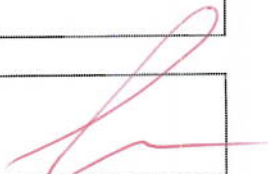
Балл:	4	9	Проверил:	B, h	
-------	---	---	-----------	------	---

Задание 14

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1. В развитых странах произошла промышленная революция. Использование (термическое) тяжелой промышленности, транспорта и т.п., а также дешевые, не экологичные технологии привели к сильному загрязнению окружающей среды.

2. Экологический кризис ^{можно} избежать, если использовать более экологичные технологии (без выбросов, ир.), повышать эффективность использования оборудования, использовать альтернативные источники энергии.

Балл:	4	9	Проверил:	B, h	
-------	---	---	-----------	------	---

Задание 15

Приведите три положения. За положение от 0 до 2 баллов. Всего за задание 6 баллов.

1. Сохранение биоразнообразия позволяет сохранить уникальные виды в естественной среде обитания, что позволяет сохранить больше экосистем планеты в ее первоначальном состоянии. Забота о будущем планеты.
2. На территории развитых стран данное разнообразие может быть утеряно, в то время как в развивающихся условиях среды еще благоприятна. Поэтому со стороны развитых стран это помощь для стран малоимущих.
3. Все связано со всем. Сохраняя биоразнообразие в развивающихся странах и восстанавливая в развитых возможно возвращение измененных экосистем в исходное состояние (стабильное)

Балл:


6 6

Проверил:

ВН

Задание 16

Ответьте на вопросы. За ответ от 0 до 2 баллов. Всего за задание 4 балла.

1. По мере роста доходов человек может обеспечить себе более высокий уровень образования. А также у него появляются лишние средства, которые он старается рационально использовать.	
Видя сост. окружающей среды, многие начинают вкладываться в сохранение природы.	
2. По мере роста образования человек больше узнает об экосистемах, о биосфере; он может спрогнозировать последствия своей деятельности, опираясь на научные знания. Следовательно, он начинает осознать перспективы развития мира и пытается найти пути решения проблемы.	
Балл:	3 3
Проверил:	Вн 

Министерство образования и науки Пермского края
МАОУ «Лицей №2» г. Перми

Изучение влияния полиаминов на переход бактерий от планктонного образа жизни к формированию биопленок

Автор: Косачева Оксана
11 биологический класс
Руководитель: Нестерова Л.Ю.,
к.б.н., доцент каф. Физиологии
растений и микроорганизмов
ПГНИУ

Пермь 2019

Содержание

Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	5
1.1 Биопленки	5
1.1.1 Понятие «биопленка»	5
1.1.2 Фазы развития биопленки	6
1.1.3 Значение биопленок	8
1.1.4 Регуляция биопленкообразования	10
1.2. Полиамины	12
1.2.1 Строение	12
1.2.2 Биологическая роль	13
1.3 Характеристика микроорганизмов - объектов исследования	14
1.3.1 Лактобактерии (<i>Lactobacillus</i>)	14
1.3.2 <i>Vibrio harveyi</i>	15
1.3.3 <i>Chromobacterium violaceum</i>	16
1.3.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
Глава 2. Материалы и методы	19
2.1 Объекты исследования	19
2.2 Определение удельного биопленкообразования	20
Глава 3. Результаты и обсуждение	23
Выводы	29
Список источников	30

Введение

Микроорганизмы – самые многочисленные существа на Земле, которые обитают практически повсеместно. Бактерии могут существовать в условиях непригодных для жизни других организмов. Одной из основных особенностей, которая позволяет им переносить воздействие неблагоприятных факторов среды является способность формировать биопленки. Известно, что в природе бактерии встречаются преимущественно в виде биопленок, однако существуют и свободноживущие одиночные виды (Мелешкин Н.С., 2017).

Биопленка - это форма существования микробных популяций (или сообществ, если в биопленке сосуществует несколько видов), фиксированных на различных абиотических и биотических поверхностях.

Биопленка обеспечивает физиологическую и функциональную стабильность популяции, является залогом конкурентного выживания в экологической нише.

Образовывать биопленки могут как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Формировать биопленки в организме человека и животных способны патогенные, условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы, а также их ассоциации.

Способность бактерий образовывать биопленки может быть использована для повышения эффективности очистки воды, разложении органических отходов и других процессов, в которых применяются бактерии. А также для контроля образования нежелательной биопленки.

В настоящее время, способность бактерий образовывать биопленки создает большие проблемы в медицинской практике. Считается, что до 80 % всех бактериальных инфекций человека связаны с образованием биопленок.

Бактериальные биопленки устойчивы к действию антибиотиков, дезинфицирующих веществ. Биопленки выстилают постоянные катетеры, внутренние имплантаты, контактные линзы и протезы (Марданова А.М. и др., 2016).

В связи с этим, актуально подробное изучение процессов, приводящих к переходу микроорганизмов от планктонного образа жизни к формированию биопленок.

Часто биопленки образуются бактериями вследствие наступления неблагоприятных условий для их существования. Образование биопленок регулируется многими внешними и внутренними факторами. Показано, что при переходе к биопленкообразованию задействовано более 100 генов. Одними из факторов, которые могут оказывать влияние на процесс формирования биопленок, являются полиамины. Полиаминов много в окружающей среде, они образуются при разложении белков, следовательно, их много и в организме животных и человека. Полиамины оказывают множественное воздействие на физиологию клеток, могут принимать участие в регуляции экспрессии генов и регуляции по типу чувства кворума (*Quorum sensing, QS*), которые отвечают за формирование биопленок (Плакунов В.К. и др., 2017).

Целью исследовательской работы является изучение влияния биогенных полиаминов на биопленкообразование бактерий, относящихся к различным экологическим группам.

В соответствии с данной целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучение литературы по выбранной теме;
2. Исследование влияния полиаминов на формирование биопленок у бактерий рода *Lactobacillus*;
3. Изучение влияния полиаминов на формирование биопленок *Staphylococcus epidermidis*;
4. Изучение влияния полиаминов на формирование биопленок свободноживущими бактериями *Vibrio harveyi*, *Chromobacterium violaceum*.

Работа выполнена на базе лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭиГМ УрОРАН. Экспериментальная часть работы выполнена под руководством Нестеровой Л.Ю. и Цыганова И. В. (с 13 июня по 10 августа 2018 года).

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Биопленки

1.1.1 Понятие «биопленка»

Термин биопленка впервые предложил в 1978 году Дж. Костертон, описав биопленку как сообщество бактерий, заключенных в матрикс (Побожьева Л.В., Копецкий И.С., 2012).

Известно, что в природе микроорганизмы (грибы и бактерии) способны в различных условиях переключаться между свободноживущим и прикрепленным состояниями, используя биопленку как фактор защиты от неблагоприятных условий среды, колонизации, патогенности и вирулентности (Марданова А.М. и др., 2016).

В естественной среде биопленка – многовидовое микробное сообщество, дающее защиту бактериям, которые в свою очередь делятся генетическим материалом друг с другом и заполняют различные ниши в биопленке (Мелешкин Н.С., 2017). Некоторые ученые считают, что такие микробные сообщества можно рассматривать как примитивные многоклеточные организмы (Marsh P.D., Egija Zaura, 2017).

Биопленки образуются в условиях текучести, на границе двух средовых фаз (жидкость – твердая поверхность, жидкость – воздух, воздух – твердая поверхность). Классическим примером биопленки может служить тонкое наложение на скалах, находящихся посреди течения. Кроме бактерий, в биопленках также могут содержаться простейшие, грибы и водоросли (Мелешкин Н.С., 2017).

Биопленка формирует тесную физическую связь между микроорганизмами, что неизбежно увеличивает вероятность возникновения взаимодействий. Если определенные ключевые воздействия на окружающую среду превышают пороговые значения, то конкуренция бактерий изменяется. Чувствительные виды будут уничтожены (хотя некоторые могут выжить благодаря защите соседних организмов), а те, которые смогут пережить неблагоприятные условия, будут процветать (Marsh P.D., Egija Zaura, 2017).

Одним из важнейших свойств микробных биопленок, обеспечивающих им абсолютное преобладание в природных экосистемах, является их устойчивость к воздействию экстремальных факторов среды. Устойчивость биопленочных популяций к этим факторам превосходит устойчивость планктонных популяций в сотни и тысячи раз.

Типичным примером является устойчивость микроорганизмов в биопленках к антибиотикам (Плакунов В.К. и др., 2017). В настоящее время популярно представление о существовании в биопленках особых «персистирующих» клеток. Персистерами называют незначительную часть популяции бактерий (менее 0,1%), обладающих повышенной устойчивостью к противомикробным препаратам, обеспечивающих устойчивость всех бактерий биопленки к антибиотикам (Хаова Е.А. и др, 2017).

Зрелая биопленка имеет сложную трехмерную структуру, может изменять свой размер и форму (Марданова А.М. и др.,2016). Сами бактерии составляют лишь 5-35% от биопленки, остальная часть – это межбактериальный матрикс (Мелешкин Н.С., 2017). Матрикс защищает биопленку от внешних угроз. Матрикс на 97% состоит из связанной воды. По своей структуре он напоминает «губку», пропускающую низкомолекулярные соединения, но задерживающую крупные молекулы.

Основными компонентами матрикса являются полисахариды (составляют до 80%) , белки (до 40% от общего объема) и внеклеточная ДНК (*eDNA*, которая участвует в горизонтальном переносе генов, суммарное ее содержание невелико). Состав матрикса может сильно варьироваться в зависимости от условий среды и вида микроорганизмов (Марданова А.М. и др.,2016).

1.1.2 Фазы развития биопленки

Формирование микробных биопленок протекает в несколько стадий, главными из которых являются следующие: 1) первичная абсорбция микробных клеток на поверхности раздела фаз; 2) обратимая адгезия микробных клеток на биотических и или абиотических поверхностях; 3) необратимая ад-

гезия микробных клеток; 4) созревание биопленок; 5) стадия дисперсии с освобождением микробных клеток в окружающую среду.

Абсорбция обусловлена избытком свободной энергии поверхностных молекул. Она определяется гидродинамическими и электростатическими силами и слабо зависит от химического состава поверхности.

В первичной (обратимой) адгезии микробных клеток участвуют как специальные клеточные структуры (жгутики, пили), так и ряд специфических химических соединений - адгезинов. Особенности имеет аппарат адгезии некоторых архей, состоящий из специальных белковых структур, называемых «хами». Эта стадия обратима, так как клетки могут вернуться к планктонной форме существования. Состав и структура поверхности могут значительно влиять на процесс первичной адгезии (Плакунов В.К. и др., 2017).

Второй этап адгезии заключается в окончательном прикреплении клеток к поверхности и называется *фиксацией*. На этой стадии микробы выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочное закрепление на поверхности (Марданова А.М. и др., 2016). Завершение необратимой адгезии микробных клеток создает условия для обмена сигнальными молекулами и запуска экспрессии генов, определяющих биопленочный фенотип (Плакунов В.К. и др., 2017).

На этапе созревания биопленок образуются *микротолинии* - отдельные скопления адгезированных клеток (Марданова А.М. и др., 2016). В самом начале происходит, так называемое, формирование плацдарма на поверхности, которое заключается в активном делении. Как только бактерии установили плацдарм, они начинают претерпевать ряд изменений, которые адаптируют их к жизни на поверхности (Мелешкин Н.С., 2017). И, наконец, образуется зрелая биопленка.

Также, особенно при низком содержании питательных веществ, клетки способны покидать биопленку и переходить в планктонную форму. В результате от биопленки периодически отрываются отдельные клетки, способные

через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию (Марданова А.М. и др.,2016).

Для описания способов освобождения микробных клеток применяют три термина: «эрозия»- освобождение отдельных или небольших групп клеток на ранних стадиях формирования биопленок; «шелушение»- отделение клеток на поздних стадиях формирования биопленок и «рассеивание» - активный процесс освобождения большого числа микробных клеток, способствующий распространению популяций на новые районы обитания.

Термин дисперсия, применяющийся при процессе разрушения биопленки под действием антибиопленочных агентов, совпадает по смыслу с термином рассеивание. Под влиянием антибиопленочных агентов биопленка подвергается отслоению в виде крупных фрагментов, содержащих в основном мертвые клетки. Однако если воздействовать на зрелые биопленки индивидуальными антибиопленочными агентами, разрушающими матрикс, может произойти массовое распространение патогенных микроорганизмов (Плакунов В.К. и др., 2017).

1.1.3 Значение биопленок

Образование бактериями биопленок, с одной стороны, создает для человека большие сложности, но, в то же время, активно используется в различных отраслях.

В организме человека микробные биопленки образуют все представители нормальной микрофлоры и возбудители болезней. С появлением последних начинается развитие инфекции. Сегодня по данным Центров по контролю и профилактике заболеваний США доказано, что более 70% инфекций человека обязательно сопровождается образованием биопленок. В их число входит большая часть заболеваний дыхательной системы.

Когда было установлено, что в биопленках бактерии могут выживать в присутствии высоких концентраций антибиотиков, стало очевидным, что для выбора схем эффективной терапии требуются новые антимикробные препараты и переоценка процесса их действия на известные патогенные микроор-

ганизмы. Помимо этого, бактерии в биопленке гораздо более устойчивы к факторам иммунитета, нежели отдельные колонии (Мелешкин Н.С., 2017).

В настоящее время в хирургии на первый план выходят проблемы микробных биопленок, которые образуются на медицинских имплантатах, катетерах, протезах и технических конструкциях, имплантированных во время операций. Хронические инфекции имплантированных медицинских устройств могут вести к развитию сепсиса и смерти пациентов.

В биотехнологии обрастание микроорганизмами абиотических поверхностей также считается крайне нежелательным. Очистка биореакторов, турбин и фильтров от биопленок требует существенных затрат, и не всегда эффективна (Марданова А.М. и др., 2016).

В то же время, сообщества микроорганизмов способны реализовывать нормальные метаболические циклы в природных условиях. Например, плотные биопленки – бактериальные маты – образуются на стенах пещер, на поверхности минеральных отложений и вокруг горячих источников. Хорошо изучены маты фотосинтезирующих, метаногенных бактериальных сообществ, а также сообщество микроорганизмов, развивающееся в очистных сооружениях сточных вод.

Микроорганизмы ризосферы и ризопланы образуют биопленки на поверхности корней и корешков растений. Эти микроорганизмы способны стимулировать рост растений, выделяя огромное количество различных биологически активных соединений, а также способны защищать растения от патогенной микрофлоры почв.

В организме человека представители нормальной микрофлоры образуют биопленки на поверхности различных органов и тканей. В форме биопленок существует микрофлора слизистых полости рта, кишечника и кожи человека (Марданова А.М. и др., 2016).

Кроме использования биопленок для очистки воды в системах очистных сооружений воды, в последнее время бурно развивается область применения биопленок для биосинтеза ценных биологически активных веществ,

получения электрической энергии и синтеза токопроводящих структур (нанопроводов) (Плакунов В.К., и др., 2017).

1.1.4 Регуляция биопленкообразования

Существует множество генетически детерминированных программ, регулирующих процессы биопленкообразования на разных стадиях.

В настоящее время можно выделить несколько перспективных направлений в борьбе с биопленками:

- 1) минимизация начальной адгезии микробных клеток;
- 2) разработка методов проникновения через матрикс биопленки различных биоцидов и антибиотиков с целью подавления активности клеток внутри зрелой биопленки;
- 3) блокировка синтеза или разрушение матрикса;
- 4) нарушение межклеточного обмена информацией (ингибирование QS регуляции).

Существенными звеньями этих процессов на ранних стадиях являются взаимодействия по типу клетка-среда и клетка-поверхность. На поздних же стадиях регуляция несколько изменяет свой характер (Марданова А.М. и др., 2016).

В процессе инвазии бактерий в клетки хозяина принимают участие факторы патогенности, в составе которых: адгезины, стимуляторы биопленкообразования, компоненты системы транспорта железа, токсины. Все они могут рассматриваться как перспективные мишени для борьбы с формированием биопленок. Но многообразие механизмов адгезии оставляет мало надежды на подбор универсального антибиопленочного агента.

В процессе созревания биопленок определяющую роль играют два типа систем регуляции метаболизма: Системы QS и системы, зависящей от циклического дигуанозинмонофосфата (Плакунов В.К. и др., 2017).

Кворум-сенсинг (*чувство кворума, quorum sensing, QS*) – это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. Благодаря *quorum sensin* достигается высокая степень координации

экспрессии генов и механизмов адаптации. Роль мессенджеро-аутоиндукторов у грамотрицательных бактерий выполняют *N*-ацетилгомосеринлактоны (АГЛ), а у грамположительных бактерий - олигопептиды. Сигналы QS-системы могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на формирование биопленок (Марданова А.М. и др., 2016).

Ингибиторы АГЛ-системы рассматриваются как перспективные антибиопленочные агенты. К ним можно отнести триклозан, иммуцилин А, фурановые соединения (Плакунов В.К. и др., 2017).

Другими важными регуляторами формирования биопленок являются *c*-di-GMP (циклический ди-гуанозин-монофосфат) (Марданова А.М. и др., 2016). У большинства бактерий высокий уровень *c*-di-GMP способствует прикрепленному способу существования, тогда как низкий его уровень стимулирует подвижность и переход к планктонному способу существования. *c*-di-GMP может вносить вклад в устойчивость бактерий к антибиотикам, независимо от формирования ими биопленок (Плакунов В.К. и др., 2017).

К пробиопленочным агентам относят: антибиотики, ионы железа, фосфора триптофан, индол (Плакунов В.К. и др., 2017).

В большинстве случаев эффект используемых соединений видоспецифичен, т.е. зависит от физиологических особенностей микроорганизма, естественных условий его обитания, его вирулентных и патогенных свойств (Марданова А.М. и др., 2016).

Отдельно остановимся на влиянии полиаминов на процесс биопленкообразования. Мнения, в какую группу (антибиопленочных или пробиопленочных агентов) их можно отнести, расходятся. Некоторые авторы считают, что полиамины стимулируют биопленкообразование (Марданова А.М. и др., 2016). Другие склонны считать иначе. Так в исследовании Live L. Nesse наблюдали, что полиамины (норспермин и спермидин) ингибировали производство биопленки *E. coli* примерно на 90%. Напротив, концентрация полиамина от 100 до 1000 мкМ вызвала небольшое, но статистически значимое

увеличение образования биопленки всеми штаммами *S. enterica*, за которым последовало снижение производства биопленки при более высоких концентрациях. Помимо этого наблюдалось увеличение pH среды с увеличением концентрации полиамина (Live L. Nesse и др.,2015).

Таким образом, несмотря на многочисленные исследования, которые предпринимаются в последние годы, механизмы перехода бактерий от планктонного образа жизни к формированию биопленок остаются не до конца ясными, а сведения об участии полиаминов в этих процессах немногочисленны и противоречивы и требуют дальнейшего изучения.

1.2 Полиамины

1.2.1 Строение

Полиамины, как видно из названия, содержат две или более первичные аминогруппы (-NH₂). Это небольшие молекулы алифатических углеводов, которые имеют положительный заряд при физиологическом pH (Live L.Nesse и др.,2015).

Наиболее распространены в природе следующие полиамины:

NH₂(CH₂)₄NH₂ — путресцин (1,4-диаминобутан),

NH₂(CH₂)₅NH₂ — кадаверин (1,5-диаминопентан),

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH₂ — спермидин,

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)NH₂ — спермин.

Известны и другие полиамины: норспермин, термоспермин, ацетилспермидин и другие (Березов Т.Т. и др, 2012; Ткаченко и др.,2011).

Путресцин и кадаверин синтезируются преимущественно в клетках прокариот, в то время как спермидин и спермин более характерны для эукариотических клеток.

Биосинтез полиаминов связан с ключевым белком-энзимом ODC, который преобразовывает орнитин аминокислоты в путресцин (Michele Linsalata и др, 2014).

Реакции образования спермина и спермидина проходят с участием двух ферментов: спермидин и сперминсинтазы, эти полиамины образуются из путресцина (Березов Т.Т. и др, 2012).

Метаболизм полиаминов зависит от уровней аминокислот-предшественников аргинина и орнитина (Michele Linsalata и др, 2014). Производство полиаминов уменьшается с возрастом из-за снижения количества ферментов, катализирующих реакции их синтеза (Polyamine. ORYZA. 2011).

1.2.2 Биологическая роль

Полиамины присутствуют во всех живых клетках. Они выполняют важные физиологические функции в организме, участвуя в контроле клеточного роста, дифференциации клеток и регуляции генной экспрессии.

Полиамины в большом количестве встречаются в окружающей среде, в организме животных и человека. Полиамины способны стабилизировать клеточные структуры – мембраны клеток, митохондрий, рибосомы, лизосомы, а также защищать клетки от продуктов перекисного окисления липидов и свободных радикалов.

Полиамины могут выступать в качестве лигандов на участках ДНК, РНК, белков, фосфолипидов и нуклеотид-трифосфатов (Michele Linsalata и др, 2014).

Наряду с хорошо изученной ролью полиаминов, показана способность полиаминов выступать в роли модуляторов нейромедиаторных систем мозга.

Образование в процессе распада полиаминов токсических альдегидов 3-аминопропаналя и акролеина является фактором гибели нейронов при ишемии мозга, рассеянном склерозе и болезни Альцгеймера (Т.Т. Березов и др, 2012).

Полиамины предотвращают атеросклероз и нормализуют рост волос благодаря своим противовоспалительным свойствам (Polyamine. ORYZA. 2011).

У бактерий полиамины выполняют различные функции, включая межклеточную сигнализацию, стрессоустойчивость, синтез РНК и белков, вирулентность.

Помимо прочего, полиамины могут принимать участие в регуляции экспрессии генов и регуляции по типу *чувства кворума*, которые отвечают за формирование биопленок (Плакунов В.К. и др., 2017).

У бактерий полиамины участвуют в образовании биопленок, что указывает на то, что эти вещества могут иметь потенциал в контроле нежелательной биопленки (Live L.Nesse и др., 2015).

1.3 Характеристика микроорганизмов – объектов исследования

1.3.1 Лактобактерии (*Lactobacillus*)

Лактобактерии - род грамположительных, анаэробных, неспорообразующих бактерий. Также их можно называть лактобациллами (Лукомская К.А., 1987).

Лактобактерии относятся к молочнокислым бактериям, широко распространенной группе, характеризующейся образованием молочной кислоты в качестве единственного или основного продукта углеводного обмена (Walter J., 2008).

Лактобактерии имеют правильную форму длинных палочек, иногда бывают кокковидными, могут располагаться в коротких цепочках или поодиночке (Лукомская К.А., 1987).

Лактобактерии встречаются в растениях или материалах растительного происхождения, ферментированных продуктах питания (йогурт, сыр и др.), а также в полости рта, желудочно-кишечном тракте животных и человека, являются обязательным компонентом вагинальной микрофлоры женщин.

Однако популяции большинства видов лактобацилл, обнаруженных в желудочно-кишечном тракте млекопитающих неустойчивы и показывают временную численную динамику. Что не позволяет назвать их истинными кишечными обитателями (Walter J., 2008).

Культуры молочнокислых бактерий широко применяются для производства лечебно-профилактических продуктов питания, медицинских и ветеринарных препаратов, оказывающих широкий спектр действия на организм человека и сельскохозяйственных животных.

Молочнокислые бактерии общепризнанными микроорганизмами, безопасными для здоровья человека (Ирkitова А.Н., Мацюра А.В., 2017).

Лактобактерии стимулируют механизмы защиты организма человека, в том числе увеличение скорости регенерации клеток слизистой оболочки. Влияют на синтез антител к патогенным микроорганизмам, активируют фагоцитоз.

Род лактобактерий, наряду с бифидобактериями, содержит наибольшее число видов и отдельных штаммов пробиотиков. Пробиотики – микроорганизмы, которые могут быть полезны для здоровья человека (Лукомская К.А., 1987).

1.3.2 *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi – гамотрицательная, биолюминесцентная морская бактерия рода *Vibrio*.

Vibrio harveyi, палочковидные, подвижные (за счет полярных жгутиков), факультативно анаэробные, галофильные микроорганизмы. *Vibrio harveyi* можно найти в тропических морях, в составе кишечной микрофлоры морских животных. Это как основной, так и условно-патогенный сожитель морских организмов, в числе которых, кораллы, устрицы, креветки, омары, морские коньки (Лукомская К.А., 1987). Эти микроорганизмы составляют около 5% проб вод. Хотя их относительно немного, они являются доминирующими бактериями в океане.

Vibrio harveyi встречается как в прикрепленном к поверхности состоянии, так и в свободно плавающим в толще воды виде. Океаны бедны питательными веществами и не идеальны для гетеротрофов. Большинство накопленных питательных веществ происходит на органических и неорганических

субстратах, и вибрионы могут использовать эти питательные вещества через образование биопленки.

Известно, что у видов *Vibrio* чувство кворума активирует биолюминесценцию, одновременно регулируя образование биопленок (Elizabeth Bolton, 2012). *Vibrio harveyi* считается причиной эффекта «Молочного моря», когда, в ночное время, испускается равномерное голубое свечение из морской воды (Ramaiah N. D., Chandramohan D., 1992).

Большинство вибрионов производят несколько хитиназ, которые являются факторами вирулентности в патогенезе морских членистоногих (Elizabeth Bolton, 2012).

1.3.3 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum – грамотрицательная, крупная, подвижная бактерия. Факультативный анаэроб (Kumar M R, 2012). Свободно живущий микроорганизм, обычно встречается в почвах и воде тропических и субтропических регионов, с температурой около 20°C-37°C (Chen С.Н. и др., 2003).

Геном *Chromobacterium violaceum* показывает, что эта бактерия использует несколько альтернативных путей метаболизма, способна адаптироваться к широкому диапазону экологических факторов (Chen С.Н. и др., 2003).

Организм вырабатывает природный антибиотик под названием виолацеин (фиолетовый пигмент), который потенциально может быть полезен при лечении рака толстой кишки и других видов рака (Kumar M R, 2012). Биосинтез виолацеина регулируется за счет чувства кворума, общего механизма, регулирующего различные другие вторичные пути метаболизма грамотрицательных бактерий.

Chromobacterium violaceum также вырабатывает необычные сахаристые соединения, такие как внеклеточные полисахариды и липополисахариды (<http://www.freepatent.ru/patents/2580105>).

Способность микроорганизма к производству цианазы позволяет использовать *Chromobacterium violaceum* в биоремедиации, например в переработке

хроматного арсената меди, или предоставление альтернативных способов добычи золота из руды без использования раствора цианида. Разлив цианидов вызывает загрязнение окружающей среды (Chen С.Н, и др., 2003).

Биоактивное соединение, полученное из культур вида *Chromobacterium*, может быть использовано эффективного регулирования численности насекомых вредителей (<http://www.freepatent.ru/patents/2580105>).

1.3.4 *Staphylococcus epidermidis*

Стафилококки – грамположительные микроорганизмы, факультативные анаэробы. Отдельные клетки стафилококков, имеющие форму правильного шара, при размножении образуют скопления в виде гроздьев винограда (Лукомская К.А.,1987).

Заболевания человека, отличающиеся разнообразием клинических проявлений, вызывают золотистые, реже - эпидермальные и еще реже - сапрофитные стафилококки. Стафилококки секретируют ряд токсинов, которые образуют каналы в цитоплазматической мембране клеток, что приводит к нарушению осмотического давления и лизису. Стафилококки обладают способностью вызывать гнойно-воспалительные процессы, что может привести к сепсису.

Организм здорового человека обладает значительной устойчивостью к стафилококкам. После перенесенной стафилококковой инфекции в крови появляются антитоксины.

В течение долгого времени *Staphylococcus epidermidis* считался безвредным комменсалом кожи и слизистых оболочек организма человека. Однако в настоящее время известно, что этот организм является одним из основных внутрибольничных патогенов, вызывающих инфекции на медицинских имплантатах. По статистике *S.aureusi* *S. epidermidis* вызывают 40% - 50% инфекций протезов клапанов сердца, и 50% -70% катетеров покрываются биопленками, образованными этими бактериями (Каюмов А.Р. и др., 2017).

Распространение эпидермального стафилококка при внутрибольничных инфекциях обусловлено его способностью прилипать и формировать биопленки на поверхности биоматериалов. Эта характеристика один из самых важных факторов вирулентности.

Высокая устойчивость клеток биопленки *Staphylococcus epidermidis* к противомикробным препаратам повысила интерес к разработкам новых стратегий борьбы с этой патогенной бактерией (Gomes F. и др, 2011).

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов в исследовании использовались следующие виды, принадлежащие к роду лактобактерий, *L. Acidophilus*, *L. Crispatus*, *L. Brevis* и *L. Plantarum*, штаммы *Chromobacterium violaceum* 31535, *Vibrio harveyi* 120 и штамм *Staphylococcus epidermidis* из коллекции лаборатории адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Отдельно приводим характеристику использованных видов лактобактерий.

Lactobacillus acidophilus - вид грамположительных бактерий рода *Lactobacillus*. Естественная среда обитания для *L. acidophilus* желудочно-желудочный тракт человека и животных, встречаются также во влагалище, ротовой полости. Некоторые штаммы *L. acidophilus* можно использовать как пробиотики, для изготовления молочнокислых продуктов.

Lactobacillus crispatus встречается во влагалище, влагалищных выделениях, в желудочно-кишечном тракте позвоночных. Является пробиотическим агентом.

Lactobacillus brevis-грамположительный, палочковидный вид молочнокислых бактерий. Его много встречается в окружающей среде, заквашенных продуктах питания. Входит в состав нормальной микрофлоры кишечника, влагалища человека.

Lactobacillus plantarum- грамположительная бактерия, широко распространенный вид рода *Lactobacillus*. Встречается во многих ферментированных пищевых продуктах, присутствует в слюне (из которой впервые был выделен).

Характеристика других видов, изученных организмов приведена в обзоре литературы.

Перед экспериментом штаммы, сохраняемые на скошенном агаре, высевали на LB-бульон (в случае *Lactobacillus*, *Chromobacterium violaceum* и *Staphylococcus epidermidis*) или на LBS-бульон (отличающийся от LB-

бульона 15% содержанием поваренной соли), в случае *Vibrio harveyi*, так как последний является морским микроорганизмом. После пробирики с культурой помещали в термостат и выдерживали в определенных условиях: *Lactobacillus* и *Chromobacterium violaceum* при температуре 37°C выращивали в течение двух суток, *Staphylococcus epidermidis* при температуре 37°C выростал спустя 10-12 часов с момента посева, *Vibrio harveyi* выращивали при температуре 28-30°C в течение 14-16 часов. Выросшую культуру использовали в дальнейших экспериментах.

2.2. Методика определения удельного биопленкообразования (SBF)

На спектрофотометре определяли исходную оптическую плотность выросшей культуры при длине волны 600 нм. Далее культуру доводили соответствующей средой до оптической плотности, равной 0,1 (в объеме 5 мл). Затем культуру разводили в 10 раз добавлением питательной среды и использовали в качестве инокулята.

В работе использовали в 96-луночные полистироловые плоскодонные планшеты, которые заполняли в соответствии с таблицей 1.

Таб.1 Заполнение планшета

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		кон- троль	Pt/Sd 0,05мМ	Pt/Sd 0,1мМ	Pt/Sd 1мМ	Pt/Sd 5мМ	Cd/Sm 0,05мМ	Cd/Sm 0,1мМ	Cd/Sm 1мМ	Cd/Sm 5мМ	контроль	
C		кон- троль	Pt/Sd 0,05мМ	Pt/Sd 0,1мМ	Pt/Sd 1мМ	Pt/Sd 5мМ	Cd/Sm 0,05мМ	Cd/Sm 0,1мМ	Cd/Sm 1мМ	Cd/Sm 5мМ	контроль	
D		кон- троль	Pt/Sd 0,05мМ	Pt/Sd 0,1мМ	Pt/Sd 1мМ	Pt/Sd 5мМ	Cd/Sm 0,05мМ	Cd/Sm 0,1мМ	Cd/Sm 1мМ	Cd/Sm 5мМ	контроль	
E		кон- троль	Pt/Sd 0,05мМ	Pt/Sd 0,1мМ	Pt/Sd 1мМ	Pt/Sd 5мМ	Cd/Sm 0,05мМ	Cd/Sm 0,1мМ	Cd/Sm 1мМ	Cd/Sm 5мМ	контроль	
F		кон- троль	Pt/Sd 0,05мМ	Pt/Sd 0,1мМ	Pt/Sd 1мМ	Pt/Sd 5мМ	Cd/Sm 0,05мМ	Cd/Sm 0,1мМ	Cd/Sm 1мМ	Cd/Sm 5мМ	контроль	
G		кон- троль	Pt/Sd 0,05мМ	Pt/Sd 0,1мМ	Pt/Sd 1мМ	Pt/Sd 5мМ	Cd/Sm 0,05мМ	Cd/Sm 0,1мМ	Cd/Sm 1мМ	Cd/Sm 5мМ	контроль	
H												

На один вид микроорганизма уходило по два планшета. В одном планшете исследовали влияние путресцина (Pt) и кадаверина (Cd), во втором - влияние спермина (Sm) и спермидина (Sd). В таблице используемые полиамины приведены через знак «слеш». Ниже наименования полиамина указана его концентрация в каждой лунке. В работе использовалось 3-4 различных концентрации.

Крайние лунки заполняли физраствором (контроль чистоты эксперимента). В лунки контроля вносили 20 мкл физраствора и 180 мкл инокулята. В опытные лунки вносили полиамины в нужной концентрации и 180 мкл инокулята. Конечный объем во всех случаях составлял 200 мкл.

Планшеты помещали в термостат с соответствующей температурой для культивирования. По истечении времени, необходимого для образования биопленок, измеряли оптическую плотность при длине волны 625 нм, с использованием мультимодального планшетного ридера Tecan Infinity M200».

Далее из планшетов удаляли культуру, дважды промывали внесением дистиллированной воды объемом 200 мкл в каждую лунку и подсушивали в течение 20 минут.

После того как планшеты подсохли, в каждую лунку вносили 150 мкл 0,1% фиолетового красителя – генцианвиолета. Оставляли планшеты на 30 минут, чтобы биопленки бактерий успели окраситься, после чего промывали 5 раз 200 мкл воды и снова подсушивали.

После того как планшеты полностью высохали, в каждую лунку вносили 200 мкл 96% этанола и через час измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм.

Для количественной оценки способности микроорганизмов формировать биопленки использовали понятие удельное биопленкообразование (SBF).

Расчет удельного биопленкообразования (SBF) проводили по формуле:
$$SBF = (OD_{570} - OD_{\text{контр.}}) / OD_{625},$$

где SBF – удельное биопленкообразование; OD_{570} – оптическая плотность культуры при длине волны 570 нм; OD контр. – оптическая плотность контрольной лунки при длине волны 570 нм; OD_{625} – оптическая плотность культуры при длине волны 625 нм после культивирования в планшете (Nave и др., 2008).

На основании данных, полученных в ходе 3-8 экспериментов, для каждого микроорганизма были построены графики зависимости удельного биопленкообразования от концентрации полиаминов в среде культивирования.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Как уже отмечалось ранее, полиамины встречаются во всех живых клетках, образуются при разложении белков. Полиамины в большом количестве синтезируют микро- и макроорганизмы. Таким образом, присутствуя повсеместно, эти соединения могут оказывать влияние на жизнедеятельность, как свободноживущих бактерий, так и бактерий симбионтов и паразитов млекопитающих и человека.

В качестве объектов исследования нами были использованы представители одиночных, свободноживущих бактерий и бактерий, обитающих в организме человека и животных, преимущественно ведущих прикрепленный образ жизни.

В работе мы использовали «физиологические» концентрации полиаминов (до 5 мМ). Именно эти концентрации полиаминов чаще всего встречаются у живых организмов и в окружающей среде (Tabor C.W., Tabor H, 1985).

Для видов лактобактерий *L. Acidophilus*, *L. Brevis* и *L. Plantarum* присутствие различных концентраций полиаминов значительного влияния на способность к биопленкообразованию не оказывало. Как видно по графикам (рис 1,2,3), с повышением концентрации полиаминов биопленкообразование у данных штаммов неизменно увеличивалось, но не более чем в 1,4 раза.



Рис 1. Влияние полиаминов на биопленкообразование *L. Acidophilus*



Рис 2. Влияние полиаминов на биопленкообразование *L. Brevis*



Рис 3. Влияние полиаминов на биопленкообразование *L. Plantarum*

Наиболее сильная стимуляция биопленкообразования отмечалась у *L. Crispatus* (рис. 4). В присутствии спермидина и спермина в концентрациях 0,1-1 мМ биопленкообразование этого вида лактобактерий возросло в 1,5-2,5 раза.

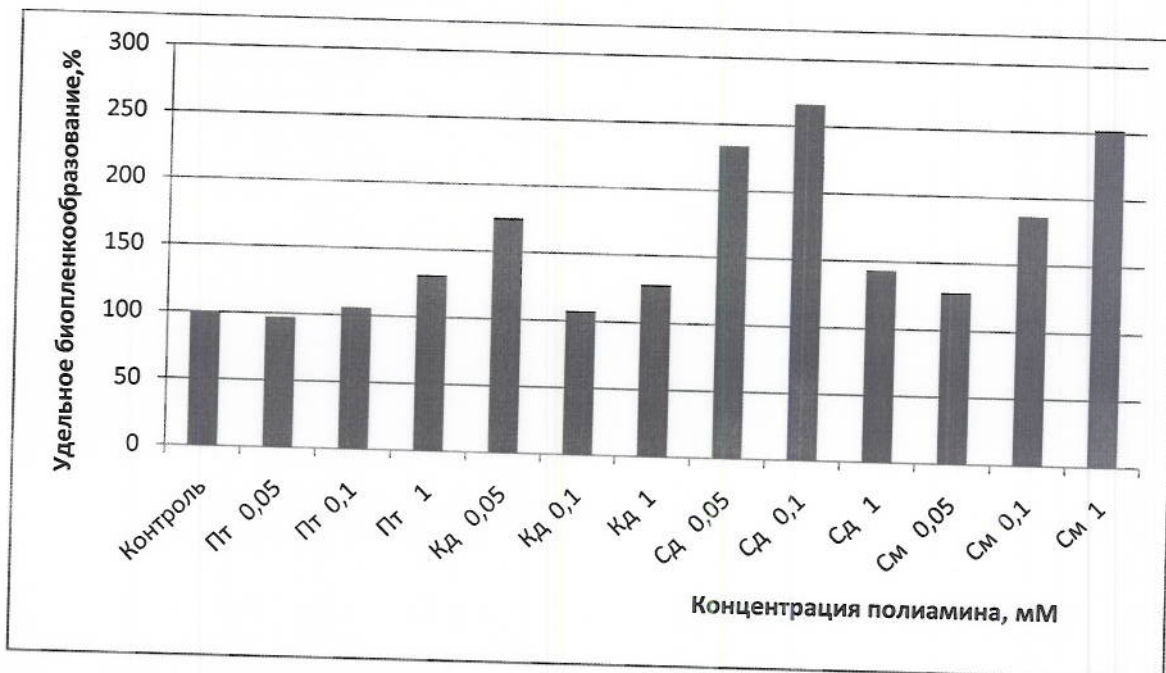


Рис 4. Влияние полиаминов на биопленкообразование *L. Crispatus*

У другого грамположительного микроорганизма, *Staphylococcus epidermidis* действие полиаминов было разнонаправленно. Высокие концентрации спермидина и спермина незначительно стимулировали биопленкообразование, в то время как низкие концентрации подавляли этот процесс. В свою очередь, путресцин и кадаверин подавляли формирование биопленок (рис 5).

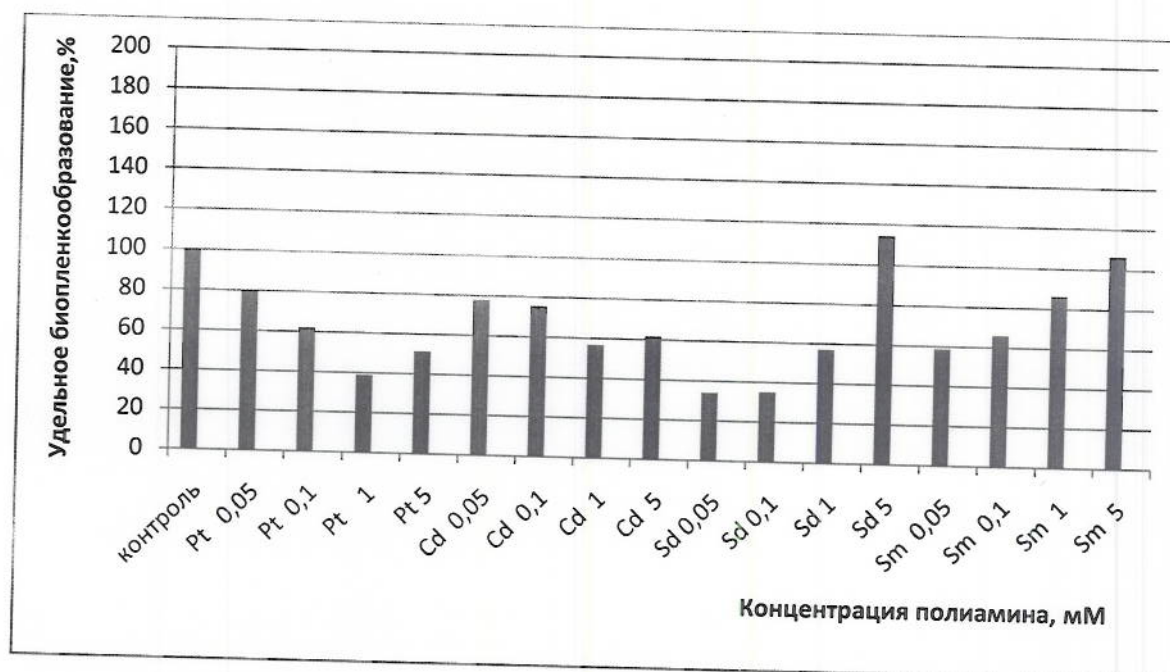


Рис 5. Влияние полиаминов на биопленкообразование *Staphylococcus epidermidis*

С увеличением концентрации полиаминов в среде их влияние на процесс формирования биопленки усиливалось. Следует отметить, что

Staphylococcus epidermidis единственный микроорганизм из исследованных нами, у которого полиамины вызвали ингибирование биопленкообразования.

У грамотрицательных микроорганизмов: *Vibrio harveyi* и *Chromobacterium violaceum* полиамины способствовали увеличению способности формировать биопленки. Биопленкообразование у данных организмов при высоких концентрациях полиаминов возрастало в 3,5-4 раза. Причем наибольший стимулирующий эффект оказывали спермидин и спермин. Кадаверин и путресцин у *Chromobacterium violaceum* незначительно увеличивали биопленкообразование (рис 6). У *Vibrio harveyi* все полиамины заметно увеличивали удельное биопленкообразование (рис 7).

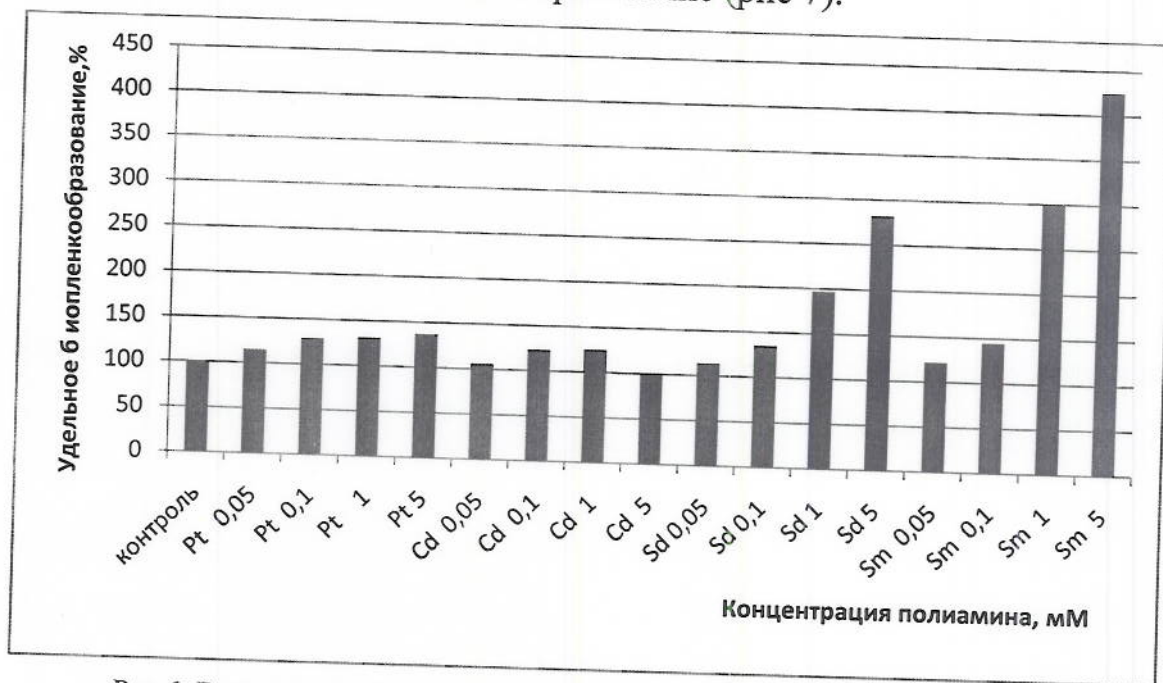


Рис 6. Влияние полиаминов на биопленкообразование *Chromobacterium violaceum*



Рис 7. Влияние полиаминов на биопленкообразование *Vibrio harveyi*

Таким образом, наиболее сильная стимуляция биопленкообразования полиаминами наблюдалась у грамотрицательных бактерий видов *Vibrio harveyi* и *Chromobacterium violaceum*. У грамположительных бактерий рода *Lactobacillus* внесение миллимолярных концентраций полиаминов в среду культивирования также оказывало стимулирующий эффект на процесс образования биопленки. Наиболее сильно биопленкообразование возрастало у *L. Crispatus* при использовании спермидина и спермина. *Staphylococcus epidermidis* единственный из исследованных микроорганизмов, у которого полиамины (кадаверин и путресцин) способствовали снижению биопленкообразования.

Данные результаты могут быть объяснены с использованием фактов из литературы. Известно, что грамотрицательные микроорганизмы в большом количестве синтезируют полиамины: путресцин, кадаверин и спермидин (С.W.Tabor,Н.Tabor,1985). В клетках *Vibrio harveyi* и *Chromobacterium violaceum* полиамины присутствуют в миллимолярных концентрациях (Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. 2017, Негорелова Е.В., и др. 2018.). Также известно, что бактерии рода *Lactobacillus* способны синтезировать собственные полиамины (Jae-hoChoi и др, 2014). Но в литературе нет

сведений, что полиамины встречаются у бактерий рода *Staphylococcus*, также как и других грамположительных кокков.

Бактерии в основном продуцируют в качестве полиаминов кадверин и путресцин, в меньших количествах спермин и спермидин (Igarashi, Kashiwagi, 2011). В то время как эукариотические организмы синтезируют спермин и спермидин. Многие виды бактерий вступают в различные по характеру взаимоотношения с эукариотами (симбиотические отношения, паразитизм, комменсализм и тд.). А прикрепленное существование внутри крупного эукариотического организма дает ряд преимуществ.

Следовательно, в естественной среде обитания бактерий рода *Staphylococcus* чаще встречаются полиамины спермин и спермидин. Возможно, их присутствие в относительно высоких концентрациях служит для бактерий толчком к переходу от планктонной стадии к формированию биопленки, чтобы обеспечить большую стабильность популяции. В то время как присутствие кадаверина и путресцина может быть обусловлено присутствием грамотрицательных микроорганизмов и выступать в виде антагонистического фактора.

Механизмы, посредством которых полиамины могут оказывать влияние на формирование биопленок, до конца не ясны. Известно, что полиамины могут оказывать влияние на экспрессию генов, в том числе задействованных в биопленкообразовании (Igarashi K., Kashiwagi K. 2011). Возможно, влияние этих соединений на процесс биопленкообразование опосредовано их воздействием на процесс QS. Можно предположить возможность влияния полиаминов на этот процесс через изменение поверхностных свойств бактериальных клеток, поскольку полиамины при физиологических значениях pH несут положительный заряд и способны взаимодействовать с отрицательно заряженными компонентами клеточной поверхности.

Таким образом, изучение механизмов влияния полиаминов на формирование биопленок бактериями требует дальнейшего изучения.

Выводы

1. Биогенные полиамины оказывали влияние на биопленкообразование бактерий различных групп. Эти соединения могут быть одним из факторов перехода от планктонного образа жизни к формированию биопленок.
2. Биогенные полиамины способны стимулировать биопленкообразование как у бактерий свободноживущих, так и у бактерий ведущих преимущественно прикрепленный образ жизни.
3. Путресцин и кадаверин стимулировали биопленкообразование бактерий, способных к их продукции (*Lactobacillus*, *Vibrio harveyi* и *Chromobacterium violaceum*) и подавляли образование биопленок у бактерий неспособных к их продукции (*Staphylococcus epidermidis*).
4. Спермидин и спермин, которые преимущественно синтезируются эукариотами, стимулировали биопленкообразование всех исследованных микроорганизмов.

Список источников

1. Березов Т.Т. Полиамины: их роль в норме и при патологии центральной нервной системы / Березов Т. Т., Маклецова М. Г., Федорова Т. Н. // Экспериментальная неврология. 2012. Т. 6. № 2. С. 38-41.
2. Иркитова А.Н. Эколого-биологическая характеристика *Lactobacillus acidophilus* / Иркитова А.Н., Мацюра А.В. // Ukrainian Journal of Ecology. 2017. №7(4). С. 214-230.
3. Биопленки как фактор патогенности *Staphylococcus aureus*: подходы к терапии / Под общ. ред. Каюмова А.Р. Казань: Изд-во КФУ, 2017. 99 с.
4. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. Москва: Просвещение, 1987. 192 с.
5. Марданова, А.М. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования: Учебно-методическое пособие / А.М. Марданова, Д.А. Кабанов, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова. Казань: центр печати Линк, 2016. 48 с.
6. Мелешкин Н.С. Биопленка как форма существования микроорганизмов. Действие факторов иммунной системы // Международный студенческий научный вестник. 2017. №2. С. 32-33.
7. Негорелова Е.В. Полиамины стимулируют биопленкообразование и продукцию аутоиндуктора-2 у грамотрицательных бактерий / Негорелова Е.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. // Материалы II-й Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни», Пермь 2018. 2018. С.94-96.
8. Нестерова Л.Ю. Биогенные полиамины принимают участие в регуляции Quorum Sensing- зависимых процессов у бактерий / Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. // Материалы I-ого Российского Микробиологического конгресса, Пущино, 17-18 октября 2017. 2017. С. 116-117.
9. Плакунов В. К. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты / Плакунов В. К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. // Микробиология. 2017. Т. 86. №4. С. 402-420.

10. Побожьева Л.В. Роль биопленки в патогенезе воспалительных заболеваний полости рта и способы ее устранения / Побожьева Л.В., Копецкий И.С. // Лечебное дело. 2012. №2. С. 9-13.
11. Ткаченко А.Г. Полиамины как регуляторы биопленкообразования природных изолятов *Escherichia coli* с разной степенью устойчивости к фторхинолонам / Ткаченко А.Г., Нестерова Л.Ю., Караваева Е.А. // Вестник Пермского университета. Биология. Микробиология. 2011. Вып. 2. С. 32-37.
12. Хаова Е.А. Регуляция бактериальной персистенции полиаминами через стимуляцию экспрессии генов *groS*, *uqjD* и *rmf* / Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г. // Вестник Оренбургского государственного университета. 2017. № 9 (209). С. 100-105.
13. Bolton Elizabeth R. Assessment of Dim Mutants of the *Vibrio harveyi* species isolated from the Gulf of Mexico // University of Wisconsin Milwaukee UWM Digital Commons. Theses and Dissertations. 2012. № 7. P.1-38.
14. Chen C.H. *Chromobacterium violaceum* bacteremia: a case report / Chen C.H., Lin L.C., Liu C.E., Young T.G. // *Microbiol Immunol Infect.* 2003. № 36 (2). P 141–144.
15. Gomes F. Strategies to control *Staphylococcus epidermidis* biofilms / Gomes F., Leite B., Teixeira P., Oliveira R. // *FORMATEX.* 2011. № 2. P.843-852.
16. Igarashi K. Characterization of genes for polyamine modulon / Igarashi K., Kashiwagi K. // *Methods in Molecular Biology.* 2011. V/720. P. 51-65.
17. Jae-ho Choi. DNA-protection by Polyamines in *Lactobacillus sakei* / Jae-ho Choi, Ki-sok Kim, Hyung-ki Do, Cher-won Hwang // *Clinical & Experimental Pathology.* 2014. V. 5. № 2. P. 1-3.
18. Kumar M. R. *Chromobacterium violaceum*: A rare bacterium isolated from a wound over the scalp // *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* 2012. № 2 (1). P. 70-72.
19. Live L. Nesse. Effects of Norspermidine and Spermidine on Biofilm Formation by Potentially Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Wild Type

Strains / Live L. Nesse, Kristin Berg, Lene K. Vestby. // American Society for Microbiology Journals. 2015. V.8. № 6. P. 2226-2232.

20. Marsh P.D. Dental biofilm:ecological interaction in health and disease / Marsh P.D., Egija Zaura // Journal Of Clinical Periodontology. 2017. № 44 (18). P. 12-22.

21. Michele Linsalata. Pharmacological and dietary agents for colorectal cancer chemoprevention: Effects on polyamine metabolism / Michele Linsalata, Orlando Antonella, Russo Francesco // International Journal of Oncology. 2014. V. 45. №.5. P. 1802-1812

22. Naves, P. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains / P. Naves *at el.* // Microbial Pathogenesis. 2008. V. 45. P. 86-91.

23. Ramaiah N. D. Ecology and biology of luminous bacteria in the Arabian Sea / Ramaiah N. D., Chandramohan D. // Oceanography of the Indian Ocean. New Delhi: Oxford and India Book House. 1992. P. 11–23.

24. Tabor C.W. Polyamines in Microorganisms / Tabor C.W., Tabor H. // Microbiological Reviews. 1985. V.49. № 1. P.81-99

25. Walter J. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research // American Society for Microbiology Journals. 2008. V. 74. № 16. P. 4985-4996.

26. Polyamine: Natural Ingredient for Healthy Hair and Nail Treatment with Anti-ageing // ORYZA. 2011. №1 P. 2-26

27. Сайт: <http://www.freepatent.ru/patents/2580105>