



ЭКОЛОГИЯ

УДК 579.262

Влияние загрязняющих веществ на интенсивность образования биопленки штаммом *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245

А. В. Гильдебрант, Д. Н. Кушнарева, А. В. Каплина,
А. И. Мозговая, И. С. Сазыкин, М. А. Сазыкина

Гильдебрант Анастасия Викторовна, аспирант кафедры экологии и природопользования Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, gildebrant@sfedu.ru

Кушнарева Дарья Николаевна, студент Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, dkushnaryova@sfedu.ru

Каплина Алина Владимировна, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, akaplina@sfedu.ru

Мозговая Анастасия Игоревна, студент бакалавриата Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, anasyu@sfedu.ru

Сазыкин Иван Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, issa@sfedu.ru

Сазыкина Марина Александровна, доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией экологии и молекулярной биологии, профессор кафедры биохимии и микробиологии Академии биологии и биотехнологии имени Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, samara@sfedu.ru

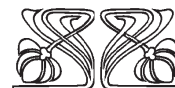
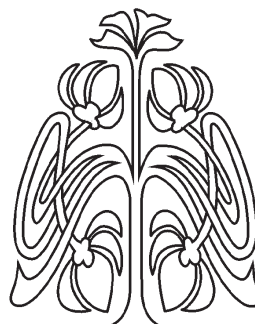
Большинство микроорганизмов в природе существует в форме биопленок. В связи с этим актуален вопрос исследования влияния различных веществ на процесс их формирования. В статье представлены данные о влиянии различных групп загрязняющих веществ, таких как антибиотики (ампициллин, окситетрацилин), антисептики (диоксидин, хлоргексидин), гербициды (глифосат, клопиралид) и соли тяжелых металлов (CuSO_4 , HgCl_2) в различных концентрациях на интенсивность образования биопленки штаммом *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245. Для определения интенсивности образования биопленки использован метод окрашивания кристаллическим фиолетовым. Показано, что внутри каждой группы исследованных веществ отдельные вещества по-разному влияют на биопленкообразование. Максимальное стимулирующее действие оказывает HgCl_2 в концентрации 0,27 мкг/мл, максимальное угнетающее – окситетрацилин (2,5 и 25 мкг/мл) и диоксидин (100 и 1000 мкг/мл) – в данных концентрациях развитие биопленки не было выявлено.

Ключевые слова: биопленка, *Vibrio aquamarinus*, ампициллин, окситетрацилин, глифосат, клопиралид, диоксидин, хлоргексидин, сульфат меди, хлорид ртути.

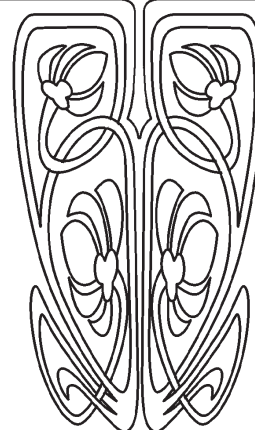
DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-103-111>

Введение

Биопленка – сообщество микроорганизмов, прикрепленных к поверхности или границе раздела фаз, в котором клетки погружены в экзопалимерный матрикс, состоящий из полисахаридов, белков и ДНК [1]. Более 90 % микроорганизмов, встречающихся в природе,



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





существуют в форме биопленок [2]. В составе биопленок микроорганизмы лучше защищены от антибиотиков и дезинфицирующих средств [3, 4].

Биопленки могут играть как положительную, так и отрицательную роль в природе. С одной стороны, микроорганизмы в форме биопленок вступают в симбиозы с другими организмами [5], а также приносят пользу в области биоремедиации, например, при очистке промышленных сточных вод [6]. С другой стороны, многие отрасли промышленности страдают от неблагоприятного воздействия образования биопленок, что может привести к большим расходам на уборку и техническое обслуживание. Примеры таких отраслей – медицина (стоматология и больницы), производство продуктов питания, бумаги, масла, оптики [7]. Опасными для здоровья человека являются бактерии, образующие биопленки на хирургических инструментах, таких как сердечные клапаны и катетеры. Около 65% бактериальных инфекций связано с биопленками [8]. Биопленки, образующиеся в трубах систем канализации, нефтепроводов, участвуют в биокоррозионных процессах. Биопленки, образованные в системах питьевого водоснабжения, могут стать резервуаром патогенных микроорганизмов [9].

Из-за широкого распространения в природе бактериальных биопленок и их вовлеченности во множество процессов существует необходимость изучения влияния различных веществ на процесс их образования.

Материалы и методы

Для исследования образования биопленок использовался штамм *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245, выделенный сотрудниками лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов АБиБ ЮФУ из прибрежных вод Черного моря в районе поселка Абрау-Дюрсо.

Для исследования влияния на образование биопленок были выбраны представители следующих групп веществ: 1) антибиотики: ампициллин («Синтез») и окситетрациклина гидрохлорид («Агрофарм»), 2) гербициды: глифосат (глифосата кислоты изопропиламидная соль, «Агрокиллер») и клопиралид («Лонтрел»), 3) антисептики: диоксидин («Новосибхимфарм») и хлоргексидина биглюконат («Росбио»), 4) соли тяжелых металлов: CuSO_4 («Акватест»), HgCl_2 («Акватест»).

Для количественного определения образования биопленок использовали метод окрашивания кристаллическим фиолетовым [10] с некоторыми модификациями.

Культуру *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 выращивали в течение суток на среде LB [11]

с 3%-ным содержанием NaCl при температуре 25 °С. Затем суспензию суточной культуры разводили средой LB с 3%-ным содержанием NaCl до мутности, соответствующей 1 единице Мак Фарланда (концентрация $3 \cdot 10^8$ клеток/мл). Мутность измерялась при помощи денситометра DEN-1 («BioSan»). После чего культуру разводили до плотности $1 \cdot 10^8$ клеток/мл.

Полученную суспензию в количестве 180 мкл вносили в лунки полистиролового планшета (Wallac, Финляндия). В качестве отрицательного контроля служил стерильный бульон. Затем к суспензии добавляли 20 мкл исследуемых веществ в различной концентрации. Часть лунок служила положительным контролем, в них добавляли 20 мкл деионизированной воды.

Планшет накрывали крышкой, заворачивали пленкой Parafilm (Bemis Company, США). После инкубации при 25 °С в течение 72 ч проводилось окрашивание. Содержимое каждой лунки удаляли при помощи дозатора, после чего лунки промывали три раза 250 мкл стерильного физиологического раствора. Планшеты интенсивно встряхивали для удаления всех неадгезированных бактерий. Адгезированные бактерии фиксировали 200 мкл 96% этанола в течение 15 мин. После того как планшеты высыхали на воздухе, в лунки вносили 200 мкл 0,5% кристаллического фиолетового по Хукеру [12]. Через 10 мин краситель удаляли. Избыточный краситель отмывали путем трехкратной промывки 250 мкл водопроводной воды. После того как планшет высыхал на воздухе, краситель в лунках, связанный с адгезированными клетками, растворяли 200 мкл 96% этанола. Уровень экстракции (абсорбции) кристаллического фиолетового этанолом измеряли через 60 мин при длине волны 570 нм с использованием планшетного ридера FLUOstarOmega (BMG LABTECH, Германия) в единицах оптической плотности (Ед, ОП570). Интенсивность окрашивания содержимого лунок красителем была пропорциональна интенсивности образования биопленки.

Статистический анализ проводили методом вычисления *t*-критерия Стьюдента [13].

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования представлены на рис. 1–4.

Микроорганизмы в составе биопленок обладают большей устойчивостью к антибиотикам [14]. Поэтому важно, чтобы антибиотик был способен проявлять свою активность по отношению к микроорганизмам в их составе.

Ампициллин – полусинтетический антибиотик группы пенициллинов, является бактерицид-



ным, антибактериальным препаратом широкого спектра действия, ингибирует транспептидазу, препятствует образованию пептидных связей и, нарушая поздние этапы синтеза пептидогликана клеточной стенки делящегося микроорганизма, вызывает лизис бактерий [15].

Окситетрациклина гидрохлорид относится к антибактериальным препаратам из группы тетрациклинов, обладает широким спектром антибактериального действия. Связываясь с 30S субъединицей на бактериальных рибосомах, окситетрациклин нарушает доступ tRNA-к mRNA-рибосомному комплексу, что приводит к блокаде синтеза белка и гибели микробной клетки. Применяется для лечения сельскохозяйственных животных при болезнях бактериальной этиологии [15].

Для исследования влияния антибиотиков на интенсивность образования биопленки были приготовлены растворы в соответствии с инструкцией к данным препаратам, а также растворы, разведенные в 10 и 100 раз.

Из полученных данных видно, что антибиотики по-разному влияют на процесс образования биопленки (см. рис. 1). При внесении в питательную среду минимальной исследуемой концентрации ампициллина (0,25 мкг/мл) не зарегистрировано статистически значимых различий между интенсивностью образования биопленок в контроле и опыте. В концентрациях 2,5 мкг/мл и 25 мкг/мл ампициллин оказывает подавляющее действие на интенсивность образования биопленки – значение ОП ниже на 32,16 и 26,25% соответственно.

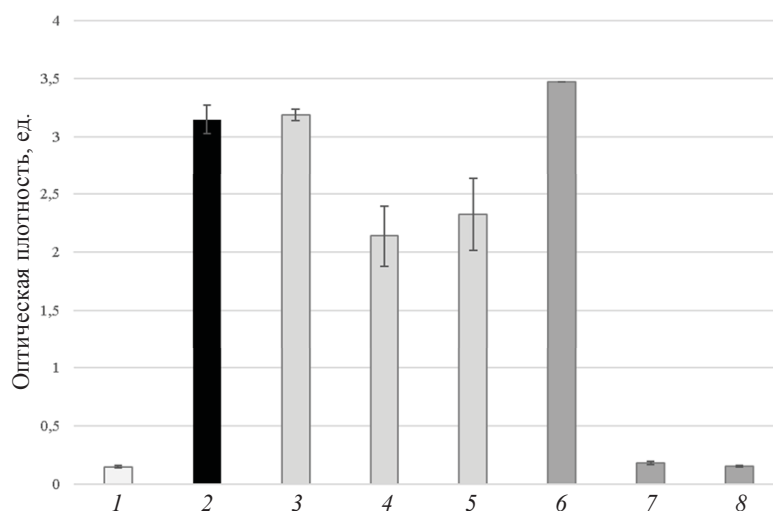


Рис. 1. Интенсивность образования биопленки (Ед. ОП 570) *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 в присутствии антибиотиков: 1 – отрицательный контроль; 2 – положительный контроль; 3 – ампициллин (0,25 мкг/мл); 4 – ампициллин (2,5 мкг/мл); 5 – ампициллин (25 мкг/мл); 6 – окситетрациклин (0,25 мкг/мл); 7 – окситетрациклин (2,5 мкг/мл); 8 – окситетрациклин (25 мкг/мл)

Окситетрациклин в минимальной концентрации (0,25 мкг/мл) оказывает стимулирующее воздействие на интенсивность образования биопленки – значения ОП в опыте выше контрольных на 10%. При увеличении концентрации в 10 и 100 раз окситетрациклин полностью подавляет развитие биопленки – значения ОП равны отрицательному контролю.

Антисептические препараты, так же как и антибиотики, должны подавлять развитие не только планктонных форм бактерий, но и биопленок.

Диоксидин (гидроксиметилхиноксалиндиоксид) – антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы производных хинок-

салина, обладает химиотерапевтической активностью при инфекциях, вызванных вульгарным протеем, дизентерийной палочкой, клебсиеллой, синегнойной палочкой, сальмонеллами, стафилококками, стрептококками, патогенными анаэробами (в том числе возбудителями газовой гангрены). Действует на штаммы бактерий, устойчивые к другим химиопрепаратам, включая антибиотики [16].

Хлоргексидин (N,N)-бис(4-хлорфенил)-3,12-диимино-2,4,11,13-тетраазатетрадекандимидамид (в виде ацетата, дигидрохлорида или ди-D-глюконата) – антисептический препарат, активен (бактерициден) в отношении большин-



ства грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных бактерий, трепонем, гонококков, трихомонад. Не действует на вирусы

и споры [17]. Результаты по влиянию антисептических препаратов на интенсивность образования биопленки представлены на рис. 2.

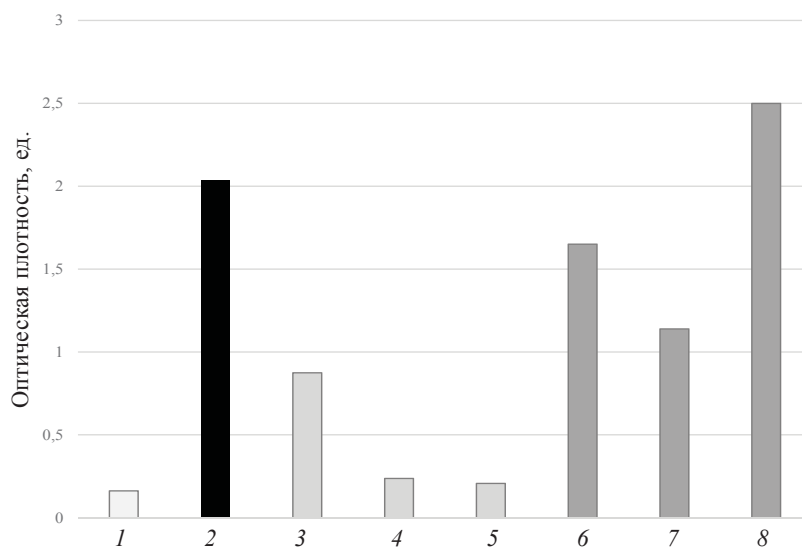


Рис. 2. Интенсивность образования биопленки (Ед. ОП 570) *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 в присутствии антисептиков: 1 – отрицательный контроль; 2 – положительный контроль; 3 – диоксидин (10 мкг/мл); 4 – диоксидин (100 мкг/мл); 5 – диоксидин (1000 мкг/мл); 6 – хлоргексидина биглюконат (0,5 мкг/мл); 7 – хлоргексидина биглюконат (5 мкг/мл); 8 – хлоргексидина биглюконат (50 мкг/мл)

Диоксидин проявляет выраженный подавляющий эффект в исследованных концентрациях. При максимальной концентрации (1000 мкг/мл), а также при ее уменьшении в 10 раз значения ОП не имеют достоверных различий с отрицательным контролем, следовательно, биопленка не развивается. При уменьшении концентрации в 100 раз (10 мкг/мл) регистрируемая ОП ниже контрольной на 57,05%.

При концентрациях хлоргексидина биглюконата 0,5 и 5 мкг/мл обнаружено подавляющее действие – ОП ниже контрольных на 18,92 и 44,03% соответственно. При концентрации 50 мкг/мл выражено стимулирующее действие – ОП выше контрольных значений на 22,80%.

Широкое применение пестицидов в сельском хозяйстве привело к загрязнению окружающей среды. В последние годы актуален вопрос безопасности пестицидов по отношению к человеку. В препаративных формах для повышения растворимости глифосат переводят в солевую форму. Большинство применяемых препаратов в качестве действующего вещества содержат его изопропиламидную соль [18].

Глифосат [N-(фосфометил)-глицин] – пестицид, арборицид, гербицид с широким спектром активности. Обладает избирательным и сплош-

ным действием, применяется для подавления однолетних и многолетних сорняков. В последние годы появились данные об острой токсичности глифосата для людей. Контакт с глифосатом ассоциируется с увеличением риска выкидышей, преждевременными родами и неходжкинской лимфомой. По данным ВОЗ, существует связь между воздействием глифосата и развитием раковых заболеваний, таких как неходжкинская лимфома и рак легких, также ВОЗ признала глифосат «потенциально канцерогенным» для людей [19].

Клопиралид [3,6-дихлорпиридин-2-карбоновая кислота] – пестицид, послевсходовый гербицид с высокой гербицидной активностью по отношению к сорнякам, устойчивым к арил-оксикалканкарбоновым кислотам и их производным. Относится к веществам 3-го класса опасности (умеренно опасное соединение) для млекопитающих [20]. В инструкции к данному препарату указано, что клопиралид практически безопасен для людей, обитателей водной, почвенной и наземно-воздушной сред.

Для исследования гербицидов были приготовлены растворы с концентрацией, указанной в инструкции к данным препаратам, а также растворы, разведенные в 10 и 100 раз. Растворы, приготовленные по инструкции, соответствовали



следующим конечным концентрациям действующих веществ: 6700 мкг/мл для глифосата и 30 мкг/мл для клопиралида. Глифосат и клопирала-

лид оказывают разное воздействие в исследованных концентрациях на интенсивность образования биопленки (см. рис. 3).

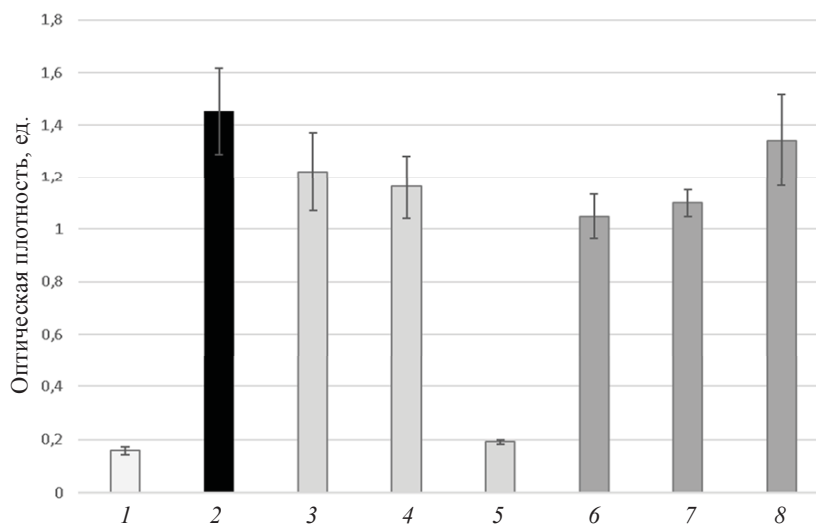


Рис. 3. Интенсивность образования биопленки (Ед. ОП 570) *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 в присутствии гербицидов: 1 – отрицательный контроль; 2 – положительный контроль; 3 – глифосат (67 мкг/мл); 4 – глифосат (670 мкг/мл); 5 – глифосат (6700 мкг/мл); 6 – клопиралид (0,3 мкг/мл); 7 – клопиралид (3 мкг/мл); 8 – клопиралид (30 мкг/мл)

Глифосат оказывает зависимое от дозы подавляющее действие на интенсивность образования биопленки. В концентрации глифосата 6700 мкг/мл значение ОП ниже контроля на 86,79%, то есть практически полностью подавляет развитие биопленки. Клопиралид же, напротив, оказывает подавляющее действие в минимальных концентрациях, при концентрации 0,3 и 3 мкг/мл, ОП ниже

контроля на 27,87 и на 24,36% соответственно.

Тяжелые металлы – стойкие химические загрязнители кумулятивного действия, обладающие специфическими токсическими свойствами [21]. В связи с возрастающим загрязнением окружающей среды солями тяжелых металлов необходимость изучения их биологических эффектов весьма актуальна.

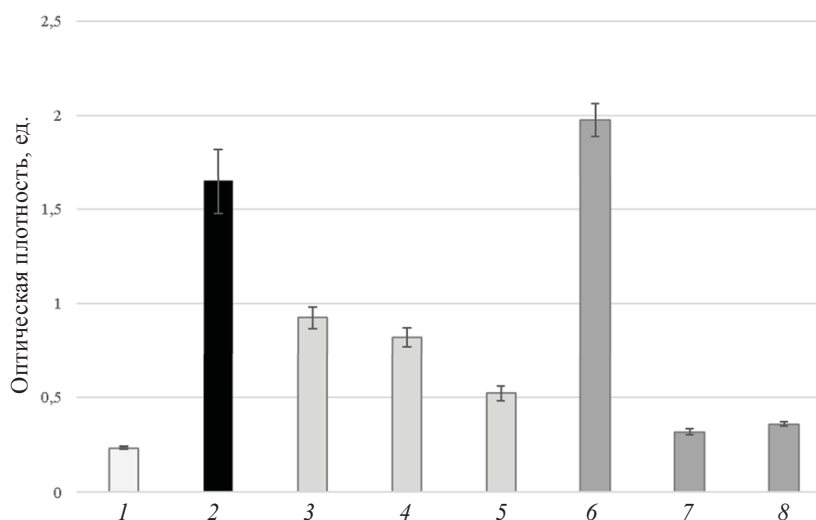


Рис. 4. Интенсивность образования биопленки (Ед. ОП 570) *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 в присутствии солей тяжелых металлов: 1 – отрицательный контроль; 2 – положительный контроль; 3 – CuSO₄ (1 мкг/мл); 4 – CuSO₄ (10 мкг/мл); 5 – CuSO₄ (100 мкг/мл); 6 – HgCl₂ (0,27 мкг/мл); 7 – HgCl₂ (2,7 мкг/мл); 8 – HgCl₂ (27 мкг/мл)



Для исследования были выбраны такие концентрации солей тяжелых металлов, при которых не подавляется клеточный метаболизм [22].

Соли тяжелых металлов показали различия во влиянии на интенсивность образования биопленки. CuSO_4 оказывает подавляющее действие, причем с повышением концентрации оно все более выражено. При концентрациях 1; 10 и 100 мкг/мл ОП ниже значений контроля на 44,03, 50,33 и на 68,56% соответственно (см. рис. 4).

HgCl_2 в минимальной из исследованных концентраций (0,27 мкг/мл) оказывает стимулирующее действие на интенсивность образования биопленки – ОП выше контрольной на 19,8%. При повышении концентрации в 10 и 100 раз HgCl_2 подавляет развитие биопленки – ОП ниже контрольных значений на 80,86 и 78,38% соответственно.

Заключение

Ампициллин подавляет развитие биопленки в концентрациях 2,5 и 25 мкг/мл (ОП ниже контрольных на 32,16 и 26,25% соответственно). Однако столь незначительного подавления развития биопленки недостаточно для эффективного лечения бактериальных инфекций. Это согласуется с данными, полученными А. В. Игнатенко [23]. Рост биопленки *E. coli* в присутствии ампициллина в концентрации 1 мкг/мл замедляется [23].

Окситетрациклин в концентрации 0,25 мкг/мл оказывает небольшое стимулирующее воздействие на интенсивность образования биопленки штаммом *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 – значения ОП выше контроля на 10%. При концентрации 2,5 и 25 мкг/мл окситетрациклин полностью подавляет развитие биопленки. Использование пониженных концентраций окситетрациклина стимулирует рост биопленок. При концентрации, указанной в инструкции к данному препарату, развитие биопленки полностью подавляется. Таким образом, чтобы добиться терапевтического эффекта, необходимо применять данный препарат строго по инструкции. Также следует проводить мониторинг окружающей среды на наличие окситетрациклина в связи с тем, что он может наносить вред природным микробным сообществам.

Исследованные антибиотики в той или иной степени подавляют развитие биопленок, что является их предназначением при лечении бактериальных инфекций. С другой стороны, они представляют угрозу для полезной микрофлоры кишечника, что свидетельствует о необходимости приема пребиотических и пробиотических препаратов во время лечения.

Диоксидин подавляет развитие биопленок – в концентрации 10 мкг/мл ОП ниже контрольной на 57,05%. При концентрации диоксидина 100 и 1000 мкг/мл биопленка не развивается. Это согласуется с результатами исследований других авторов [16], в которых отмечен бактерицидный эффект диоксидина в отношении биопленок MRSA – воздействие раствора диоксидина (10000 мкг/мл) привело к гибели 72,5% микроорганизмов. Таким образом, вышеприведенные данные говорят о том, что диоксидин является весьма эффективным антисептическим средством.

Хлоргексидин оказывает двойное воздействие на интенсивность образования биопленки. При низких концентрациях хлоргексидина (0,5 и 5 мкг/мл) формирование биопленки подавляется – ОП ниже контрольных значений на 18,92 и 44,03% соответственно. При концентрации 50 мкг/мл хлоргексидин стимулирует образование биопленки – ОП выше контроля на 22,80%. В работе Bonez с соавт. [24] также показано, что хлоргексидин по-разному влияет на различные штаммы микроорганизмов. Так, в концентрации 145 мкг/мл хлоргексидин подавляет развитие биопленок штаммов *Candida albicans* ATCC 90028 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. В то же время биопленка штамма *Escherichia coli* (ATCC 35218) оказалась устойчивой к хлоргексидину в данной концентрации. Более того, показан стимулирующий эффект для биопленок штаммов *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и MRSA, что согласуется с результатами настоящего исследования. Полученные данные свидетельствуют о том, что хлоргексидин в концентрации, рекомендованной производителем, неэффективен в качестве антисептического средства.

Глифосат оказывает значительное подавляющее действие на развитие биопленок – в концентрации 6700 мкг/мл значение ОП ниже контроля на 86,79%. Это может существенно нарушать микробоценозы почв. Кроме того, попадая в организм человека с продуктами питания, глифосат может быть опасен для микрофлоры кишечника, тем самым нанося вред здоровью. Клопиралид оказывает подавляющее действие в концентрациях 0,3 и 3 мкг/мл, ОП ниже контроля на 27,87 и на 24,36% соответственно. В концентрации, рекомендованной для применения данного гербицида, подавляющего эффекта не выражено. Полученные результаты говорят о том, что при данной концентрации идет стимулирование образования биопленки, то есть микроорганизмы таким образом защищаются от негативного влияния данного вещества.



CuSO₄ снижает интенсивность образования биопленок во всех исследованных концентрациях, причем при повышении концентрации усиливается подавляющий эффект. Так, при концентрациях 1 и 10 мкг/мл ОП ниже значений контроля на 44,03 и 50,33% соответственно, а при концентрации 100 мкг/мл – на 68,56%.

HgCl₂ в концентрации 0,27 мкг/мл стимулирует процесс биопленкообразования – ОП выше контрольной на 19,80%. При концентрациях 2,7 и 27 мкг/мл HgCl₂, напротив, подавляет развитие биопленки – ОП ниже контроля на 80,86 и 78,38% соответственно. Такие результаты говорят о том, что при концентрации 0,27 мкг/мл микроорганизмы в составе биопленки способны защититься от негативного воздействия хлорида ртути (II). Но при повышении концентрации в 10 и 100 раз HgCl₂ демонстрирует интенсивное подавляющее действие. В целом соли тяжелых металлов показали значительное угнетающее воздействие на интенсивность образования биопленок. Однако низкие концентрации HgCl₂ способны стимулировать процесс образования биопленки штаммом *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 6.2379.2017/ПЧ) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00787 А).

Список литературы

- Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents // *Future*. 2015. Vol. 7, № 4. P. 493–512.
- Rittmann B. E. Biofilms, active substrata, and me // *Water research*. 2018. Vol. 132. P. 135–145.
- Goldberg J. Biofilms and antibiotic resistance : a genetic linkage // *TRENDS in Microbiology*. 2002. Vol. 10, № 6. P. 264.
- Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent // *Intern. Journal of Food Microbiol.* 2002. Vol. 77, № 1–2. P. 11–18.
- Hobley L., Harkins C., MacPhee C. E., Stanley-Wall N. R. Giving structure to the biofilm matrix : an overview of individual strategies and emerging common themes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 39, № 5. P. 649–669.
- Sekoulov I., Brinke-Seiferth S. Application of biofiltration in the crude oil processing industry // *Water Science and Technology*. 1999. Vol. 39, № 8. P. 71–76.
- Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces // *Progress in Natural Science*. 2008. Vol. 18, № 9. P. 1049–1056.
- Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M. A., Hussain T., Ali M., Rafic M., Kamil M. A. Bacterial biofilm and associated infections // *J. of the Chinese Medical Association*. 2018. Vol. 81, № 1. P. 7–11.
- Петрухина М. И., Юценко Г. В., Полтова Н. Г. Эпидемиологическое значение бактериальных плёнок // *Журнал МедиАль*. 2015. № 3 (17). С. 9–17.
- Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation // *J. of Microbiol. Methods*. 2000. Vol. 40, № 2. P. 175–179.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning : a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1982. 479 p.
- Герхардт Ф. *Методы общей бактериологии* : в 4 т. М. : Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
- Лакин Г. Ф. *Биометрия*. М. : Высш. шк., 1990. 351 с.
- Chambless J. D., Hunt S. M., Stewart P. S. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials // *Appl. and Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 72, № 3. P. 2005–2013.
- Желдакова Р. А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов : учеб.-метод. комплекс для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология». Минск : БГУ, 2004. 111 с.
- Пиружева Т. А. Оценка антисептического воздействия на возбудителей хирургических инфекций в составе биопленок // *Всерос. итоговая 74-я студ. науч. конф. им. Н. И. Пирогова (Томск, 27–29 апреля 2015 г.)* : сб. материалов / под ред. Г. Э. Черногорюка. Томск : СГМУ, 2015. С. 97–98.
- Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс]. URL: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_142.htm (дата обращения: 14.03.18).
- Кузнецова Е. М., Чмиль В. Д. Глифосат : поведение в окружающей среде и уровни остатков // *Современные проблемы токсикологии*. 2010. № 1. С. 87–95.
- Мирошникова Д. И., Моталова Т. В. Токсикологическая характеристика пестицидов на основе глифосата // *Материалы ежегодной науч. конф. Рязанского гос. мед. ун-та имени акад. И. П. Павлова*. Рязань : РИО РязГМУ, 2016. С. 313–316.
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. М. : Минсельхоз РФ, 2017. 938 с.
- Соколов Э. М., Панарин В. М., Рылеева Е. М. Антропогенное загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами // *Экология и промышленность России*. 2008. Т. 11. С. 4–6.
- Сазыкина М. А., Чистяков В. А., Сазыкин И. С., Лагутова Л. П., Новикова Е. М., Латышев А. И. Использование бактериального lux-биосенсора для детекции загрязнения природных вод ртутью // *Вода : химия и экология*. 2010. № 5. С. 24–29.
- Игнатенко А. В. Изучение образования биопленок бактерий и оценка их устойчивости к биоцидам // *Тр. БГТУ. Сер. 4. Химия, технология органических веществ и биотехнология*. 2008. Т. 1, № 4. С. 173–176.
- Bonez P. C., dos Santos Alves C. F., Dalmolin T. V., Agertt V. A., Mizdal C. R., Flores Vda C, Marques J. B., Santos R. C., Anraku de Campos M. M. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms // *Amer. J. of Infection Control*. 2013. Vol. 41, № 12. P. e119–e122.



Образец для цитирования:

Гильдебрант А. В., Кушнарева Д. Н., Каплина А. В., Мозговая А. И., Сазыкин И. С., Сазыкина М. А. Влияние загрязняющих веществ на интенсивность образования биопленки штаммом *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 1. С. 103–111. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-103-111>

The Effect of Pollutants on the Intensity of Biofilm Formation by the Strain *Vibrio aquamarinus* VKPM В-11245

**A. V. Gildebrant, D. N. Kushnareva, A. V. Kaplina,
A. I. Mozgovaya, I. S. Sazykin, M. A. Sazykina**

Anastasia V. Gildebrant, <https://orcid.org/0000-0001-9308-2022>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don 344090, Russia, gildebrant@sfnu.ru

Daria N. Kushnareva, <https://orcid.org/0000-0003-0859-3982>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don 344090, Russia, dkushnaryova@sfnu.ru

Alina V. Kaplina, <https://orcid.org/0000-0003-3271-7957>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don 344090, Russia, akaplina@sfnu.ru

Anastasia I. Mozgovaya, <https://orcid.org/0000-0002-7376-3020>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don 344090, Russia, anasuyu@sfnu.ru

Ivan S. Sazykin, <https://orcid.org/0000-0002-0864-1473>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don 344090, Russia, issa@sfnu.ru

Marina A. Sazykina, <https://orcid.org/0000-0001-6974-3361>, Southern Federal University, 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don 344090, Russia, samara@sfnu.ru

Most microorganisms in natural conditions exist in the form of biofilms. Due to this fact, the question of research of various substances influence on their formation process is relevant. This article presents data on the influence of various groups of pollutants, such as antibiotics (ampicillin, oxytetracycline), antiseptics (dioxidine, chlorhexidine), herbicides (glyphosate, clopyralid) and salts of heavy metals (CuSO_4 , HgCl_2) in various concentrations on the intensity of biofilm formation by the strain *Vibrio aquamarinus* VKPM В-11245. To determine the intensity of biofilm formation the method of staining by crystal violet was used. It is shown that within each group of the investigated substances, the individual substances have different effects on biofilms formation. HgCl_2 in the concentration of 0.27 $\mu\text{g/ml}$ has the maximum stimulating effect, and the maximum inhibitory effect was displayed by oxytetracycline (2.5 $\mu\text{g/ml}$ and 25 $\mu\text{g/ml}$) and dioxidine (100 $\mu\text{g/ml}$ and 1000 $\mu\text{g/ml}$), as in these concentrations biofilm formation was not detected.

Keywords: biofilm, *Vibrio aquamarinus*, ampicillin, oxytetracycline, glyphosate, clopyralid, dioxidine, chlorhexidine, copper sulfate, mercuric chloride.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project no. 6.2379.2017/PC)

and by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-04-00787 A).

References

1. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H. O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 493–512.
2. Rittmann B.E. Biofilms, active substrata, and me. *Water Research*, 2018, vol. 132, pp. 135–145.
3. Goldberg J. Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. *TRENDS in Microbiology*, 2002, vol. 10, no. 6, pp. 264.
4. Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 77, no. 1–2, pp. 11–18.
5. Hogley L., Harkins C., MacPhee C. E., Stanley-Wall N. R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, vol. 39, no. 5, pp. 649–669.
6. Sekoulov I., Brinke-Seiferth S. Application of biofiltration in the crude oil processing industry. *Water science and technology*, 1999, vol. 39, no. 8, pp. 71–76.
7. Garrett T.R., Bhakoo M., Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 2008, vol. 18, no. 9, pp. 1049–1056.
8. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A., Hussain T., Ali M., Rafic M., Kamil M. A. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 2018, vol. 81, no. 1, pp. 7–11.
9. Petruhina M. I., Yushchenko G. V., Politova N. G. Epidemiologicheskoe znachenie bakterial'nyh plynok [Epidemiological value of bacterial slimes]. *Zhurnal MediAl' [Journal MediAl']*, 2015, no. 3 (17), pp. 9–17 (in Russian).
10. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, vol. 40, no. 2, pp. 175–179.
11. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 479 p.
12. *Manual of methods for general bacteriology* / by Ph. Gerhardt, Editor-in-chief R. G. E. Murray, editor I. Morphology ... [et al.]. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1981. 524 p.



13. Lakin G. F. *Biometriya* [Biometry]. Moscow, Vyssh. Shk. Publ., 1990. 351 p.
14. Chambless J. D., Hunt S. M., Stewart P. S. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, no. 3, pp. 2005–2013.
15. Zheldakova R. A. *Mekhanizmy biosinteza antibiotikov i ih dejstvie na kletki mikroorganizmov* [Mechanisms of biosynthesis of antibiotics and their effect on microorganisms cells]. Minsk, BGU, 2004. 111 p.
16. Pirueva T. A. Ocenka antisepticheskogo vozdeystviya na vzbuditelej hirurgicheskikh infekcij v sostave bioplenok [Assessment of antiseptic effects on pathogens of surgical infections in the composition of biofilms]. *Vserossiyskaya Itogovaya 74-ya studencheskaya nauchnaya konferenciya im. N. I. Pirogova (Tomsk, 27–29 aprelya 2015 g.)*: sb. materialov. Ed. G. E. Chernogoryuka. Tomsk, SGMU, 2015, pp. 97–98 (in Russian).
17. *Registr lekarstvennykh sredstv Rossii* (Register of medicinal preparations of Russia). Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_142.htm (accessed 14 March 2018) (in Russian).
18. Kuznetsova E. M., Chmil V. D. Glifosat: povedenie v okruzhayushchej srede i urovni ostatkov [Glyphosate: environmental fate and levels of residues]. *Sovremennye problemy toksikologii* [Modern Problems of Toxicology], 2010, no. 1, pp. 87–95 (in Russian).
19. Mirosnikova D. I., Motalova T. V. Toksikologo-gigienicheskaya karakteristika pesticidov na osnove glifosata [Toxicological and hygienic characteristics of glyphosate-based pesticides]. *Materialy ezhegodnoj nauchnoj konferencii Ryazanskogo gos. medicinskogo un-ta im. akademika I. P. Pavlova* [Materials of the Annual. Sci. Conf. of the Ryazan State Medical University named after acad. I. P. Pavlova]. Ryazan', RIO RyazGMU, 2016, pp. 313–316 (in Russian).
20. *Gosudarstvennyj katalog pesticidov i agrohimitov, razreshennykh k primeniyu na territorii Rossijskoj Federacii* [State catalogue of pesticides and agrochemicals permitted for use on the territory of the Russian Federation]. Moscow, Minsel'hoz RF, 2017. 938 p. (in Russian).
21. Sokolov E. M., Panarin V. M., Ryleyeva E. M. Antropogennoe zagryaznenie okruzhayushchej srede tyazhelyimi metallami [The Universal Device for Sewage Purification with Closed System of Water Rotation]. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii* [Ecology and Industry of Russia], 2008, vol. 11, pp. 4–6 (in Russian).
22. Sazykina M. A., Chistyakov V. A., Sazykin I. S., Lagutova L. P., Novikova E. M., Latyshev A. I. Ispol'zovanie bakterial'nogo lux-biosensora dlya detekcii zagryazneniya prirodnykh vod rtut'yu [Bacterial lux-biosensor for detection of mercury pollution]. *Voda: himiya i ekologiya* [Water: Chemistry and Ecology], 2010, no. 5, pp. 24–29 (in Russian).
23. Ignatenko A. V. Izuchenie obrazovaniya bioplenok bakterij i ocenka ih ustojchivosti k biocidam [Bacteria biofilms formation and estimation of their stability to biocides]. *Trudy BGTU. Ser. 4: Himiya, tekhnologiya organicheskikh veshchestv i biotekhnologiya* [Proceeding of BSTU. Ser. 4. Chemistry, Organic Substances Technology and Biotextology], 2008, vol. 1, no. 4, pp. 173–176 (in Russian).
24. Bonez P. C., dos Santos Alves C. F., Dalmolin T. V., Agertt V. A., Mizdal C. R., Flores Vda C., Marques J. B., Santos R. C., Anraku de Campos M. M. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*, 2013, vol. 41, no. 12, pp. e119–e122.

Cite this article as:

Gildebrant A. V., Kushnareva D. N., Kaplina A. V., Mozgovaya A. I., Sazykin I. S., Sazykina M. A. The Effect of Pollutants on the Intensity of Biofilm Formation by the Strain *Vibrio aquamarinus* VKPM B-11245. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 1, pp. 103–111 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-103-111>