

DOI: 10.15593/2224-9400/2017.2.03

УДК 615.324:579.873.21

Н.О. Юркина, В.П. КоробовПермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия**Т.В. Полюдова**Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
Пермская государственная сельскохозяйственная академия
им. академика Прянишникова, Пермь, Россия**ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНОВ НА АДГЕЗИЮ И ФОРМИРОВАНИЕ
БИОПЛЕНОК *Mycobacterium smegmatis***

Внедрение в практику хитозана и его производных является бесспорным достижением биотехнологических исследований. Широкий спектр биологической активности, отсутствие токсичности, биосовместимость и биodeградируемость делают хитозан и его производные востребованным в различных областях применения.

Одним из важнейших свойств хитозанов является их антимикробная активность. Вместе с тем спектр антибактериального действия различных форм хитозанов показан лишь в отношении планктонных форм бактерий. Однако согласно современным представлениям основной формой существования бактерий являются биопленки, закрепленные на поверхности сообщества микроорганизмов. Бактерии в составе биопленок обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам. Это явление создает серьезную проблему в медицине, поскольку борьба с инфекциями, связанными с биопленкообразованием, существенно усложняется. Микроорганизмы в биопленках становятся в сотни раз устойчивее к действию антибиотиков.

*В настоящей работе впервые исследовано влияние хитозанов на процессы формирования биопленок бактериями *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 – быстрорастущими нетуберкулезными микобактериями. Сходство морфологических и биохимических признаков *M. smegmatis* с их патогенными родственниками позволяет интерпретировать полученные при изучении *M. smegmatis* знания и в отношении патогенных микобактерий.*

Экспериментально установлено, что пищевой хитозан и хитозан, модифицированный путем введения в молекулу дополнительных ионогенных групп, подавляют адгезию микобактерий к полистиролу в 2–3 раза. Кроме того, наличие в среде роста обеих форм хитозанов

подавляет способность бактерий формировать биопленки. Действие хитозанов, ингибирующее развитие биопленок M. smegmatis проявляется уже при концентрации 8 мкг/мл. Это свойство исследованных хитозанов имеет дозозависимый эффект.

Ключевые слова: адгезия, бактерии, биопленки, хитозан, Mycobacterium.

N.O. Yurkina, V.P. Korobov

Perm National Research Polytechnic University,
Perm, Russian Federation

T.V. Polyudova

Institute of Ecology
and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences, Perm, Russia Federation
Perm State Agricultural Academy, Perm, Russia Federation

INFLUENCE HITOZANOV ON ADHESION AND FORMATION OF BIOFILMS OF MYCOBACTERIUM SMEGMATIS

New practical applications of chitosans and its derivatives are an undeniable achievement of biotechnological research. A wide range of biological activity, lack of toxicity, biocompatibility and biodegradability make chitosan and its derivatives actual for various applications.

One of the most important properties of chitosans is their antimicrobial activity. At the same time, antimicrobial action of various forms of chitosans has been proved only towards planktonic forms of bacteria. However, nowadays scientists consider biofilms (complex communities of microorganisms fixed on a surface) as the main form of bacteria existence. In biofilms bacteria get more resistant to a number of environmental factors. This phenomenon causes a serious problem in medicine, as the fight against biofilm-associated infections becomes rather more complicated. Moreover, biofilms formation makes microorganisms hundredfold more resistant to the action of antibiotics. The abovementioned give reasons for this study.

In the present work, the influence of chitosans on the formation of biofilms by Mycobacterium smegmatis mc² 155 – fast-growing nontuberculous mycobacteria was first studied. The similarity of morphological and biochemical features of M. smegmatis with their pathogenic relatives makes it possible to spread knowledge obtained in the study of M. smegmatis on pathogenic mycobacteria.

We have experimentally established that food chitosan and chitosan, modified by introducing additional ionogenic groups into the molecule, 2-3 times suppressed the adhesion of mycobacteria to polystyrene. In

addition, the presence in the growth medium of both forms of chitosans inhibited the ability of bacteria to form biofilms. This effect was apparent at a concentration of 8 µg / ml and had a dose-dependent effect.

Keywords: *adhesion, bacteria, biofilms, chitosan, Mycobacterium.*

Хитозаны – линейные поликатионные соединения, состоящие из остатков глюкозамина. Хитозаны нашли свое применение в таких областях деятельности, как медицина, сельское хозяйство, пищевая и текстильная промышленность, охрана окружающей среды [1]. Однако в природе хитозаны не встречаются, их получают из хитина, широко представленного в природных источниках: в составе клеточных стенок большинства грибов и некоторых водорослей, наружных покровах членистоногих и червей. Наиболее доступным и масштабным для промышленного освоения источником хитина являются панцири промысловых ракообразных. Для этих целей может быть использована и биомасса мицелиарных и высших грибов [2]. Кроме того, одомашненные насекомые вследствие их быстрого воспроизводства также могут являться хорошим источником хитина. Широкое развитие пчеловодства в нашей стране дает возможность получения хитинового сырья в значительных объемах [3].

В процессе получения хитина осуществляется удаление из исходного сырья минеральных солей, белков, жиров и пигментов. Качество хитина и хитозана во многом зависит от способа и степени удаления побочных веществ. Хитин укреплен карбоновым соединением – ацилом, придающим ему прочность. В начале XIX в. был разработан способ деацилирования хитина и получения в чистом виде нового вещества – хитозана [4]. Низкая растворимость хитозана высокой молекулярной массы ограничивает возможности его применения. Однако эту проблему решают путем химической модификации хитозана методами деполяризации, ацилирования, алкилирования и др. Это позволяет получить производные хитозана с хорошей растворимостью [5, 6]. Конкретные требования к свойствам хитина и хитозана определяются областями их практического использования, которые весьма разнообразны.

Одним из важных свойств хитозанов является их антибактериальная активность, которая проявляется в отношении бактерий родов *Staphylococcus*, *Escherichia* [7]. Кроме того, обнаружена способность хитозанов ингибировать рост микобактерий [8]. Имеется положительный опыт применения пищевого хитозана для лечения некоторых инфекционных заболеваний [9]. Однако в современной научной литературе отсутствуют данные о влиянии хитозанов на развитие бактери-

альных биопленок – особых, закрепленных на твердой поверхности сообществ микроорганизмов [10].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния пищевого и кватернизированного хитозанов на адгезию микобактерий к полистиролу и формирование этими бактериями биопленок.

Микобактерии широко распространены в природе. Часто встречаются в воде и почве [11]. Однако есть и патогенные виды, вызывающие заболевания человека и животных. Например, бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis* – возбудитель туберкулеза, *M. leprae* – возбудитель лепры, *M. bovis* – возбудитель туберкулеза рогатого скота, *M. avium* – возбудитель туберкулеза птиц [12]. Микобактерии, как и бактерии в целом, способны формировать биопленки – особые сообщества клеток, прикрепленных к поверхностям, и защищенные синтезируемым ими веществом матрикса [13].

В работе исследовали пищевой хитозан, полученный в результате реакции дезацетилирования хитина, и кватернизированный хитозан – продукт взаимодействия глицидилтриметиламмония хлорида и хитозана, приводящего к появлению в молекуле дополнительных ионогенных групп [14].

Объектом исследования служили бактерии *Mycobacterium smegmatis* mc²155, которые культивировали на жидкой питательной среде, содержащей (г/л): триптон (Fluka, США) – 10, дрожжевой экстракт (BD, США) – 5, KCl – 6,4. Для изучения интенсивности адгезии микобактерий к полистиролу 3 мл суспензии отмытых клеток (10^8 КОЕ/мл) в питательной среде вносили в полистироловые чашки Петри (диаметр 36 мм). Влияние хитозанов на адгезию исследовали, добавляя в инкубационную среду 0,3 мл раствора кватернизированного или пищевого хитозана в исходной концентрации 1 мг/мл. Чашки Петри инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем суспензии удаляли, чашки трижды промывали 3 мл стерильной воды и окрашивали 0,1%-ным раствором генцианвиолета 10 мин. Несвязавшийся краситель отмывали стерильной водой. После высушивания дно чашки Петри просматривали на микровизоре «Ломо» (Россия) с иммерсией. Количество связавшихся с поверхностью клеток просчитывали не менее чем в 10 полях зрения.

Рост биопленок микобактерий в присутствии хитозанов исследовали при культивировании бактерий в плоскодонных полистироловых планшетах. В лунки планшетов вносили указанную выше питательную среду, производили серию двукратных разведений исходных растворов

кватернизированного и пищевого хитозанов, а затем в лунки планшета вносили по 10 мкл инокулума микобактерий (10^7 КОЕ/мл) и инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток в сформированных биопленках оценивали по окрашиванию раствором тиазолил тетразолия бромид (Sigma, США) с концентрацией 0,1 мг/мл, который вносили по 100 мкл в лунки планшета на промытые биопленки. Инкубировали при 37 °С в течение 1 суток, затем формазан экстрагировали 20%-ным раствором твина 80, приготовленным на 50%-ном этаноле в течение 2 ч. Оптическую плотность экстрактов измеряли при 570 нм на планшетном спектрофотометре Benchmark Plus (BioRad, США) при длине волны 570 нм.

Результаты проведенных исследований показали эффективное ингибирующее адгезию микобактерий к полистиролу действие обоих хитозанов, однако наиболее выраженное подавление адгезии наблюдалось под действием кватернизированного хитозана (рис. 1).

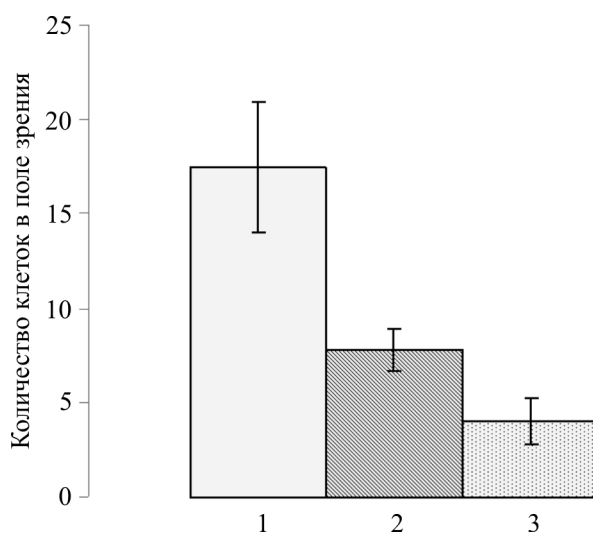


Рис. 1. Адгезия *M. smegmatis* к полистиролу в присутствии хитозанов (0,1мкг/мл): 1 – контроль (без хитозанов); 2 – пищевой хитозан; 3 – кватернизированный хитозан

Поскольку закрепление бактерий на твердой поверхности является первым этапом образования биопленок [15], дальнейшие исследования были посвящены изучению способности бактерий *M. smegmatis* мс² 155 формировать биопленки на поверхности полистирола в присутствии хитозанов.

Согласно полученным данным, наличие в среде роста микобактерий обоих хитозанов приводило к значительному уменьшению количества живых бактерий в биопленках. Существенное ингибирование роста биопленок наблюдалось в диапазоне концентраций хитозанов от 30 до 500 мкг/мл (рис. 2).

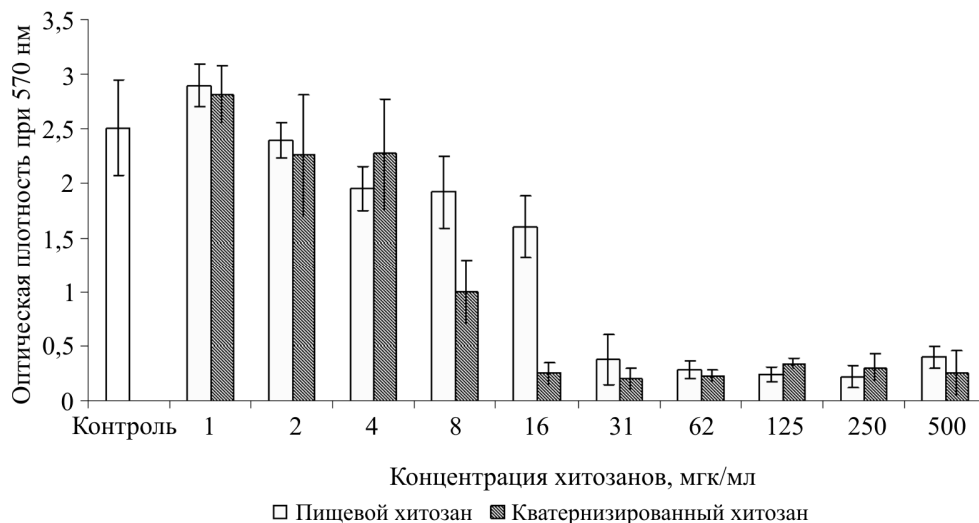


Рис. 2. Ингибирование процесса формирования биопленок бактериями *M. smegmatis* mc² 155 в присутствии хитозанов

Концентрации кватернизированного хитозана равные 8 и 16 мкг/мл также эффективно сдерживали развитие биопленок. Концентрации 4 мкг/мл и ниже не оказывали влияния на развитие биопленок *M. smegmatis*. Действие пищевого хитозана в низких концентрациях было выражено в значительно меньшей степени.

Несмотря на то, что в данных условиях не было выявлено биоцидного действия хитозанов в отношении *M. smegmatis*, нами был получен хороший бактериостатический эффект, подавляющий развитие живого компонента биопленок примерно на 80 %. Аналогичный эффект хитозанов был показан ранее Е.В. Крыжановской с соавт. на планктонных клетках нетуберкулезных микобактерий [8].

Для эффективного сравнения действия двух разновидностей хитозанов были построены кривые зависимости доза–эффект, по которым были рассчитаны концентрации хитозанов, подавляющие развитие биопленок на 50 % (IC₅₀) (рис. 3).

Так, для кватернизированного хитозана значение IC₅₀ составило 6 мкг/мл, а для пищевого – практически в 2 раза больше – 11,4 мкг/мл.

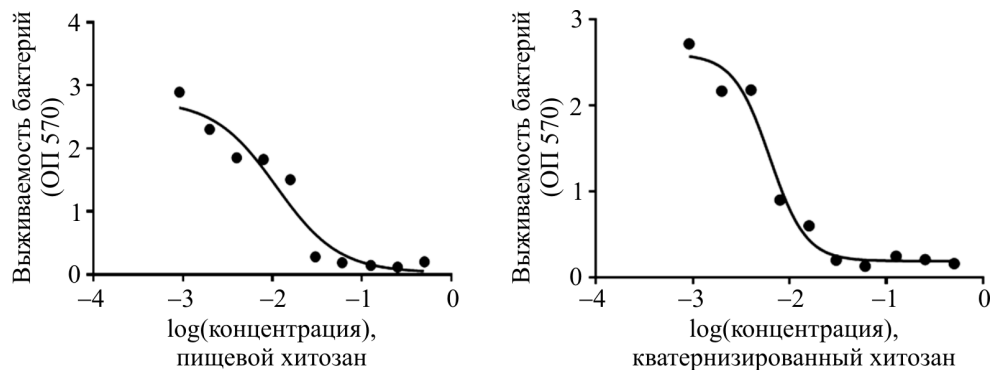


Рис. 3. Зависимости антибактериального эффекта хитозанов на развитие биопленок *M.smegmatis* mc² 155 от их дозы

Таким образом, проведенные исследования показали выраженный ингибирующий эффект хитозанов как в отношении адгезии микобактерий, так и в отношении процессов формирования зрелых биопленок этими бактериями.

Авторы выражают искреннюю благодарность доктору химических наук, профессору В.П. Варламову за предоставление пищевого и кватернизированного хитозанов.

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН проект № 15-4-4-3.

Список литературы

1. Варламов В.П. Немцев С.В., Тихонов В.Е. Хитин и хитозан: природа, получение и применение / Рос. хитиновое о-во. – М., 2010. – 292 с.
2. Хитин мицелиальных грибов: современное значение и фундаментальные основы получения / Е.П. Феофилова, И.С. Мысякина, Я.Э. Бокарева, Я.С. Сергеева // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы XII междунар. конф. – Пермь, 2014. – С. 323–328.
3. Получение хитина и хитозана из медоносных пчел / С.В. Немцев, О.Ю. Зуева, М.Р. Хисматуллин, А.И. Албулов, В.П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40, № 1. – С. 46–50.
4. Варламов В.П., Яковлева И.В. Крабы, хитин, хитозан и хитиновые общества // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы XII междунар. конф. – Пермь, 2014. – С. 78–87.

5. Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Куликов С.Н. Получение олигомеров хитозана и исследование их действия на лизис лизостафином клеточных стенок стафилококков // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы XII междунар. конф. – Пермь, 2014. – С. 355–361.

6. Formation and characterization succinoyl chitosan particles loaded with warnerin / В.Т. Shagdarova, А.V. Ilyina, S.A. Lopatin, V.P. Varlamov, V.P. Korobov, L.M. Lemkina // Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. – 2015. – Vol. 20. – P. 246–253.

7. Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Варламов В.П. Антибактериальная активность алкилированных и ацилированных производных низкомолекулярного хитозана // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, № 2. – С. 237–241.

8. Антибактериальное действие форм хитозана на штаммы *Mycobacterium* / Е.В. Крыжановская, В.П. Варламов, А.Я. Саймуленко, С.М. Албулов, С.М. Шинкарев, М.А. Фролова, Н.К. Еремец, Н.А. Бондарева, В.Б. Хабаров, А.В. Гринь // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 6. – С. 119–121.

9. Червинец В.М., Бондаренко В.М., Смоленская Л.П. Ацилакт и пищевой хитозан в лечении язвенной болезни // Материалы 8-го Всероссийского съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2002. – С. 273–274.

10. Parsek M.R., Fuqua C. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life // Journal of Bacteriology. – 2004. – Vol. 186, no. 14. – P. 4427–4440.

11. Нуралинов Р.А. Экологические условия существования популяций микобактерий // Юг России: экология, развитие. – 2014. – № 2. – С. 18–30.

12. Васильев В.Н. Микобактериозы и микозы легких. – М.: Софья, 1991. – 382 с.

13. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly / S. Sousa, M. Bandeira, P.F. Carvalho, F. Duarte, L. Jordao // International Journal of Mycobacteriology. – 2015. – Vol. 4. – P. 36–43.

14. Шагдарова Б.Ц., Левов А.Н., Варламов В.П. Получение низкомолекулярного хитозана и его производных // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3-5. – С. 1694–1696.

15. Ерошенко Д.В., Коробов В.П. Адгезия стафилококков – первый шаг к образованию биопленок // Успехи современной биологии. – 2017. – Т. 137, № 1. – С. 100–112.

References

1. Varlamov V.P., Nemtsev S.V., Tikhonov V.E. *Khitin i khitozan: priroda, poluchenie i primeneniye* [Chitin and chitosan: nature, production and application]. Moscow, Rossiiskoe khitinovie obshchestvo, 2010, 292 p.
2. Feofilova E.P., Mysiakina I.S., Bokareva Ia.E., Sergeeva Ia.S. *Khitin mitselial'nykh gribov: sovremennoe znachenie i fundamental'nye osnovy polucheniia* [Chitin of mycelial fungi: modern significance and the fundamental principles of obtaining]. *Sovremennye perspektivy v issledovanii khitina i khitozana. Materialy XII mezhdunarodnoi konferensii*. Perm, 2014, pp. 323-328.
3. Nemtsev S.V., Zueva O.Iu., Khismatullin M.R., Albulov A.I., Varlamov V.P. *Poluchenie khitina i khitozana iz medonosnykh pchel* [Getting chitin and chitosan from honey bee]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 2004, vol. 40, no. 1, pp. 46-50.
4. Varlamov V.P., Iakovleva I.V. *Kraby, khitin, khitozan i khitinovyie obshchestva* [Crabs, chitin, chitosan and chitinous societies]. *Sovremennye perspektivy v issledovanii khitina i khitozana. Materialy XII mezhdunarodnoi konferensii*. Perm, 2014, pp. 78-87.
5. Shagdarova B.Ts., Il'ina A.V., Kulikov S.N. *Poluchenie oligomerov khitozana i issledovanie ikh deistviia na lizis lizostafinom kletochnykh stenok stafilokokkov* [Preparation of chitosan oligomers and investigation of their effect on lysostaphin lysis of staphylococcal cell walls]. *Sovremennye perspektivy v issledovanii khitina i khitozana. Materialy XII mezhdunarodnoi konferensii*. Perm, 2014, pp. 355-361.
6. Shagdarova B.T., Ilyina A.V., Lopatin S.A., Varlamov V.P., Korobov V.P., Lemkina L.M. *Formation and characterization succinoyl chitosan particles loaded with warnerin*. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 2015, vol. 20, pp. 246-253.
7. Shagdarova B.Ts., Il'ina A.V., Varlamov V.P. *Antibakterial'naia aktivnost' alkilirovannykh i atsilirovannykh proizvodnykh nizkomolekuliarnogo khitozana* [Antibacterial activity of alkylated and acylated derivatives of low molecular weight chitosan]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 2016, vol. 52, no. 2, pp. 237-241.
8. Kryzhanovskaia E.V., Varlamov V.P., Saimulenko A.Ia., Albulov S.M., Shinkarev S.M., Frolova M.A., Eremets N.K., Bondareva N.A., Khabarov V.B., Grin' A.V. *Antibakterial'noe deistvie form khitozana na shtammy Mycobacterium* [Antibacterial action of forms of chitosan on strains of *Mycobacterium*]. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiia*. 2008, no. 6, pp. 119-121.

9. Chervinets V.M., Bondarenko V.M., Smolenskaia L.P. Atsilakt i pishchevoi khitozan v lechenii iazvennoi bolezni [Acylact and food chitosan in the treatment of peptic ulcer]. *Materialy 8-go Vserossiiskogo s"ezda epidemiologov, mikrobiologov i parazitologov*. Moscow, 2002, pp. 273-274.

10. Parsek M.R., Fuqua C. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. *Journal of Bacteriology*, 2004, vol. 186, no. 14, pp. 4427–4440.

11. Nuratinov R.A. Ekologicheskie usloviia sushchestvovaniia populiatsii mikobakterii [Ecological conditions for the existence of populations of mycobacteria]. *Iug Rossii: ekologiia, razvitie*, 2014, no. 2, pp. 18-30.

12. Vasil'ev V.N. Mikobakteriozy i mikozy legkikh [Mycobacteriosis and mycosis of the lungs]. Moscow, Sofiia, 199, 382 p.

13. Sousa S., Bandeira M., Carvalho P.F., Duarte F., Jordao L. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *International Journal of Mycobacteriology*, 2015, vol. 4, pp. 36–43.

14. Shagdarova B.Ts., Levov A.N., Varlamov V.P. Poluchenie nizkomolekuliarnogo khitozana i ego proizvodnykh [Preparation of low-molecular chitosan and its derivatives]. *Izvestiia Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2013, vol. 15, no. 3-5, pp. 1694-1696.

15. Eroshenko D.V., Korobov V.P. Adgeziia stafilokokkov– pervyi shag k obrazovaniuu bioplenok [Staphylococcus adhesion is the first step towards the formation of biofilms] *Uspekhi sovremennoi biologii*, 2017, vol. 137, no. 1, pp. 100-112.

Получено 01.06.2017

Об авторах

Юркина Наталья Олеговна (Пермь, Россия) – студент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: yurkina.natali1002@gmail.com).

Коробов Владимир Павлович (Пермь, Россия) – кандидат медицинских наук, доцент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета, завлабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: vvv@purec.pstu.ac.ru).

Полюдова Татьяна Вячеславовна (Пермь, Россия) – кандидат биологических наук, научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, доцент кафедры экологии Пермской государственной сельскохозяйственной академии (614084, г. Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: poludova@iegm.ru).

About the authors

Natal'ia O. Iurkina (Perm, Russian Federation) – Student, Chemistry and Biotechnology Department, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, Russian Federation, e-mail: yurkina.natali1002@gmail.com).

Vladimir P. Korobov (Perm, Russian Federation) – Ph.D. of Medical Sciences, Chemistry and Biotechnology Department, Perm National Research Polytechnic University, head of the laboratory of biochemistry of the growth of microorganisms of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, Russian Federation, e-mail: vvv@purec.pstu.ac.ru).

Poliudova Tat'iana Viacheslavovna (Perm, Russian Federation) – Ph.D. of Biological Sciences, Research associate Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ecology Department of the Perm state agricultural academy (13, Goleva str., Perm, 614084, Russian Federation, e-mail: poludova@iegm.ru).