

Гаврилова И. А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Беларусь*

Титов Л. П.

² *Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь*

АДАПТАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ НА УРОВНЕ ПОПУЛЯЦИИ И ОТДЕЛЬНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Pseudomonas aeruginosa — условно-патогенная бактерия, приобретшая важное значение в качестве этиологического агента внутрибольничных инфекций. Устойчивые к антибиотикам и другим антимикробным препаратам, включая дезинфектанты, формы этих бактерий занимают второе место среди грамотрицательных микроорганизмов по частоте выделения от пациентов с данными инфекциями [1, 2]. Основным способом предотвращения возникновения и распространения внутрибольничных инфекций является проведение адекватных дезинфекционных мероприятий с использованием дезинфицирующих средств (ДС), вызывающих быструю гибель микробов на объектах внешней среды [3–5]. Несмотря на многообразие средств химической дезинфекции, количество активно действующих веществ (АДВ), входящих в их состав, весьма ограничено. В состав ДС входят такие действующие агенты как альдегиды, спирты, четвертичные аммониевые соединения, третичные амины, галогены, перекисные соединения, фенолы, кислоты [6]. Изыскание новых АДВ, равно как и создание ДС, сдерживается недостаточной изученностью механизмов действия на микробную клетку [7]. Существующие методы исследования биологической эффективности воздействия ДС на популяцию бактерий не представляют информации о механизмах формирования устойчивости, выживании в условиях воздействия сниженных (суббиоцидных) концентраций и/или несоблюдении требуемой экспозиции, равно как и о морфоструктурных и геномических адаптационных процессах выживших бактерий, признаках «дезрезистентности» популяции бактерий, их кооперации и формировании биопленок [8].

Понимание механизмов действия ДС на бактерии требует новых знаний об их структурной организации и физических свойствах, как при физиологических состояниях, так и при воздействии неблагоприятных факторов. Исследование этих механизмов методами световой микроскопии затруднено вследствие малых размеров клеток бактерий и низкой разрешающей способностью световых микроскопов.

Применение ультрамикроскопических методов для оценки влияния средств химической дезинфекции на бактериальные клетки позволяет выявить механизмы действия биоцидов и морфологические особенности устойчивых и чувствительных бактериальных клеток, получить новые знания о структурно-функциональных изменениях бактериальных клеток под воздействием биоцидов. Эти знания могут быть использованы при создании новых методических подходов для определения

резистентности микроорганизмов, а также при поиске эффективных биоцидных веществ.

Цель данного исследования — изучить изменения культуральных свойств, ультрамикроскопической структуры и морфометрических параметров бактериальных клеток *P. aeruginosa* при воздействии дезинфицирующих средств на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) и полигексаметиленгуанидина.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись клинические изоляты синегнойной палочки с различным уровнем чувствительности к дезинфицирующим средствам, которую определяли качественным суспензионным методом [9].

Чувствительные штаммы участвовали в эксперименте по формированию устойчивости бактерий к дезинфектантам. На бактерии воздействовали дезинфицирующими средствами на основе ЧАС и полигексаметиленгуанидина в сублетальных концентрациях и высевали на плотные питательные среды. В каждом последующем пассаже участвовали бактерии, которые выжили при максимальной концентрации биоцида и выросли на питательной среде. Спустя 25 пассажей 2 штамма из 21 проявляли устойчивость к дезинфектанту на основе ЧАС, 1 штамм стал резистентным к полигексаметиленгуанидину.

Оценивались культуральные свойства полученных устойчивых вариантов, произведена сравнительная оценка морфометрических показателей у исходных штаммов и устойчивых вариантов, полученных в результате селекции, методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Изучена ультраструктура 5 чувствительных и 7 резистентных к биоцидам культур *P. aeruginosa* методом просвечивающей электронной микроскопии ультратонких срезов бактерий.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием пакета программ STATISTICA 6.1. Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Достоверность различий между статистическими параметрами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение:

Изменение морфологии колоний при воздействии сублетальной концентрации дезинфектантов. При воздействии суббиоцидных концентраций дезинфектантов отмечались однотипные морфологические изменения колоний *P. aeruginosa*. После 4–10 пассажей отмечалось уменьшение размеров колоний. Внешне колонии стали более слизистыми. После десятого пассажа отмечался полиморфизм колоний по размеру. При сравнении колоний исходного и полученного в результате селекции штаммов наблюдалось заметное уменьшение размеров колоний, колонии стали более влажными, слизистыми и блестящими, форма колоний и их цвет не изменились (рис. 1).

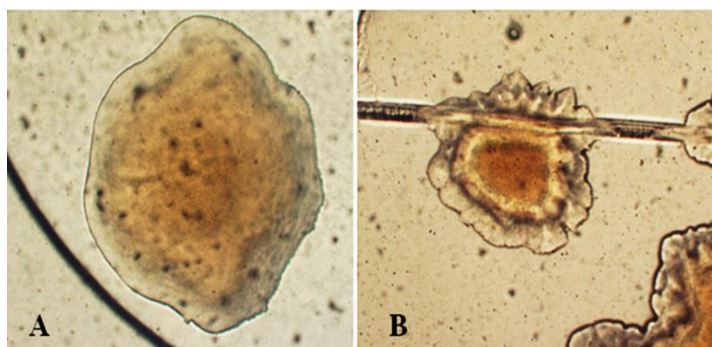


Рис. 1. Внешний вид колоний чувствительного (А) и устойчивого (В) штамма *P. aeruginosa* (увеличение $\times 4$)

Изучение бактериальной популяции методом атомно-силовой микроскопии. При анализе АСМ-фотографий исходной и полученной бактериальных популяций обращает на себя внимание преобладание в измененной при пассировании популяции бактериальных клеток, имеющих жгутики. Напротив, в исходной популяции у большинства клеток жгутики не определяются (рис. 2).

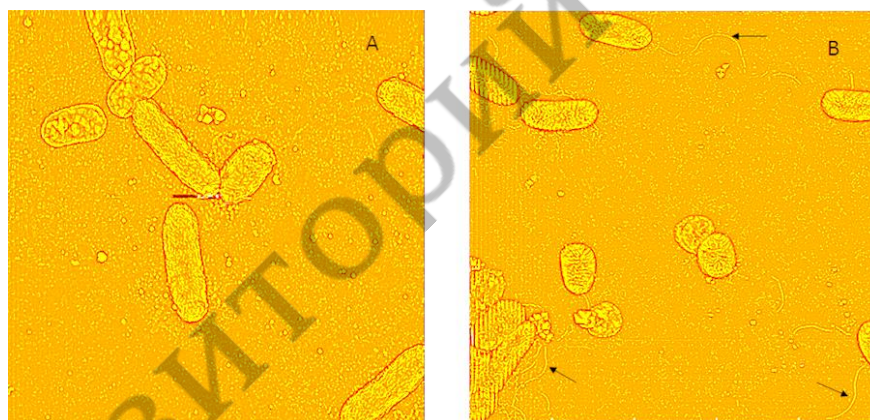


Рис. 2. АСМ-изображения чувствительных (А) и устойчивых (В) бактериальных клеток *P. aeruginosa* (размер сканов 10×10 мкм)

Размер клеток исходного штамма колебался от 1,12 до 3,1 мкм и составил в среднем 1,84–2,01 ($p < 0,05$). Размер бактерий полученного штамма колебался от 0,78 до 2,34 мкм ($p < 0,05$). Средний размер бактерий составил 1,46–1,59 мкм.

Следует также упомянуть, что на АСМ-фотографиях, сделанных после десятого пассажа, было отмечено атипичное деление бактериальной клетки синегнойной палочки с образованием впячиваний цитоплазматической мембраны в двух местах (рис. 3).

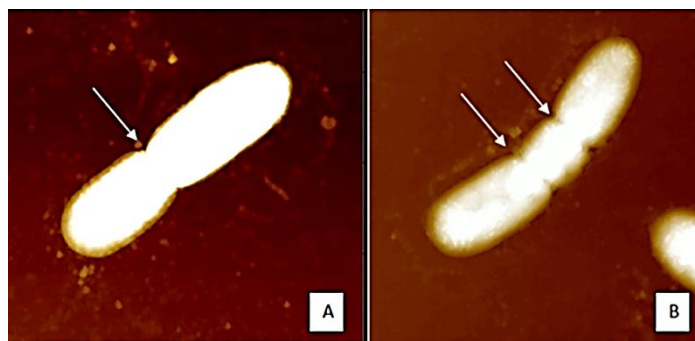


Рис. 3. АСМ-сканы делящихся клеток *P. aeruginosa* (размер сканов 4×4 мкм):
A — бинарное деление; B — деление с образованием двух клеточных перегородок

Оценка ультраструктурных различий чувствительных и резистентных к дезинфицирующим средствам бактериальных клеток с помощью электронного микроскопа (табл.).

Ультрамикроскопическая характеристика бактериальных клеток *P. aeruginosa* чувствительных и резистентных к дезинфицирующим средствам на основе полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и четвертичных аммониевых соединений

Ультрамикроскопический критерий	Чувствительные к дезинфектантам бактериальные клетки	Резистентные к дезинфектантам бактериальные клетки
Клеточная стенка (КС)	КС структурирована. Визуализируется извилистая трехслойная наружная мембрана и подлежащий слой пептидогликана. В наружной мембране просматриваются поры. Снаружи от внешней мембраны выявляется тонкий слой капсулоподобного вещества. Периплазматическое пространство хорошо выражено, у части клеток неравномерно расширено	Внешние слои КС тесно прилегают друг к другу. Наружная мембрана уплотнена, видимые поры отсутствуют. Периплазматическое пространство узкое, равномерной ширины на всем протяжении или не просматривается. У части клеток выявлены пузырьки, не отделившиеся от наружной мембраны
Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ)	ЦПМ визуализируется как трехслойная структура	ЦПМ уплотнена, слои не визуализируются. У части клеток ЦПМ визуально сливается с КС
Цитоплазматические включения	Около половины изученных клеток содержат округлые включения с ультрамикроскопическими характеристиками волутиновых гранул	Большинство клеток, помимо осмиофильных волутиноподобных включений содержит в области нуклеоида от 1 до 16 электронно-прозрачных вакуолеподобных структур, окруженных однослойной оболочкой
Состояние нуклеоида	Область нуклеоида диспергирована, определяются тонкие фибриллы хроматина	Нуклеоид отличается высокой степенью спирализации ДНК, выявляются грубые фибриллы хроматина. У части клеток область нуклеоида разрезана

Выводы:

1. При длительных воздействиях на микроорганизм суббицидных концентраций ДС отмечаются изменения культуральных свойств микроба (изменение питательных потребностей, уменьшение размеров колоний, слизевобразование).

2. Между чувствительными и резистентными к дезинфектантам микроорганизмами имеется вариабельность в морфологии и структурной организации бактериальных клеток. В результате воздействия стрессовых факторов (дезинфектанта) клетки округляются, становятся меньше по размеру, преобладают подвижные формы бактерий; наблюдается атипичное деление (биомакромаркеры резистентности к ДС).

3. Наблюдались морфологические различия как поверхностных слоёв бактериальной клетки (извилистость клеточной стенки, выраженность периплазматического пространства), так и цитоплазматических включений (биологические микромаркеры).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections* : Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 / A. I. Hidron [et al.] // *Infection control and hospital epidemiology*. 2008. Vol. 29, № 11. P. 996–1011.

2. *Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting gram-negative bacteria* / C. S. Higgins [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* 2001. № 7. P. 308–315.

3. *Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за госпитальными инфекциями* / О. В. Ковалишена [и др.] // *Ремедиум. Приволжье*. 2008. № 1 (61). С. 49–51.

4. *Семина, Н. А.* Значение дезинфекции и стерилизации в профилактике внутрибольничных инфекций / Н. А. Семина, Г. П. Ковалева, В. В. Галкин // *Дезинфекционное дело*. 2002. № 3. С. 29–31.

5. *Шандала, М. Г.* Перспективы и проблемы современной дезинфектологии / М. Г. Шандала // *Дезинфекционное дело*. 2002. № 3. С. 19–25.

6. *Современный подход к выбору дезинфицирующих средств в системе профилактики внутрибольничных инфекций (ВБИ)* / И. Ф. Веткина [и др.] // *ФАРМиндекс Практик*. 2005. Вып. 7. С. 13–20.

7. *McDonnell, G.* Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance / G. McDonnell, A. D. Russel // *Clin. Microbiol. Rev.* 1999. № 12. P. 147–149.

8. *Формирование устойчивости бактерий к четвертичным аммониевым соединениям в экспериментальных условиях* / В. В. Шкарин [и др.] // *Медицинский альманах*. 2012. № 3 (22). С. 129–133.

9. *Методы проверки и оценки антимикробной активности дезинфицирующих и антисептических средств: инструкция по применению МЗ РБ* / В. П. Филонов [и др.]. Минск, 2003. 41 с.