

Streszczenie w języku polskim

Bakterie z rodzaju *Proteus* to Gram-ujemne pałeczki powodujące najczęściej infekcje układu moczowego, zwłaszcza u pacjentów cewnikowanych. Zakażenia te przeważnie przebiegają z wytworzeniem na cewniku urologicznym inkrustowanego, niejednokrotnie wielogatunkowego biofilmu. Biofilm stanowi osiadłą, przylegającą do powierzchni formę wzrostu drobnoustrojów, których komórki otoczone są zewnątrzkomórkową macierzą (ECM). Lipopolisacharyd jest integralnym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych oraz ważnym czynnikiem ich wirulencji. Struktura LPS u wielu drobnoustrojów odgrywa rolę w formowaniu biofilmu, np. w adhezji do powierzchni.

Celem niniejszej pracy było porównanie lipopolisacharydów wybranych, klinicznych szczepów *Proteus* spp., rosnących w hodowlach płynnych (planktonicznych) oraz w postaci biofilmu.

W pracy wyselekcjonowano trzy szczepy *P. mirabilis* (spośród pięciu izolatów klinicznych *Proteus* spp.), najsilniej tworzące biofilm na polistyrenowych płytkach titracyjnych. Szczepy te należały do serogrup O78 (*P. mirabilis* 1 B-m), O11a (*P. mirabilis* 9 B-m) oraz O8a,b (*P. mirabilis* 12 B-r). W celu pozyskania dużych ilości biomas tych szczepów z biofilmu, skonstruowano szklany bioreaktor z pionowo ułożonymi płytkami szklanymi, na których osadzała się warstwa bakterii. Po przeprowadzeniu wielokrotnych hodowli trzech wybranych szczepów w bioreaktorze, z komórek bakterii wyekstrahowano lipopolisacharydy za pomocą zmodyfikowanej metody wg Westphala. Próby LPS z hodowli biofilmowych poddano następnie analizie porównawczej z lipopolisacharydami homologicznych szczepów z hodowli planktonicznych za pomocą metod SDS-PAGE, ELISA oraz *Western blot*. Otrzymane wyniki badań wskazywały na pewne różnice między próbami LPS z dwóch typów hodowli w przypadku *P. mirabilis* 1 B-m i *P. mirabilis* 9 B-m (częściowe skrócenie łańcuchów OPS oraz zmiany w budowie regionów rdzeniowych LPS z biofilmu) oraz brak różnic w przypadku szczepu *P. mirabilis* 12 B-r (w związku z tym szczep ten wykluczono z dalszych badań). W teście purpald wykazano zwiększoną zawartość Kdo w próbach LPS *P. mirabilis* 1 B-m oraz *P. mirabilis* 9 B-m z hodowli biofilmowych (wskazywało to na zwiększenie ilości niskocząsteczkowych frakcji LPS, zawierających skrócone łańcuchy OPS). Analizy porównawcze budowy chemicznej LPS (części O-swoistych – NMR, lipidów A – MALDI-TOF) z hodowli płynnych i osiadłych, badanych szczepów *P. mirabilis* (1 B-m i 9 B-m), nie wykazały

różnic ze względu na typ hodowli. W przypadku szczepu *P. mirabilis* 1 B-m wykazano wpływ rozcieńczenia podłoża hodowlanego na stopień O-acetylacji rybitolu w OPS (zaobserwowano 2,5 x wyższy poziom O-acetylacji w LPS z hodowli płynnej w 10 x rozcieńczonym podłożu, w porównaniu do LPS z tego samego typu hodowli w podłożu nierozcieńczonym). Analiza chemiczna budowy części rdzeniowych LPS (ESI HR) z dwóch form wzrostu, wykazała różnice w przypadku jednego szczepu (*P. mirabilis* 9 B-m) – w próbie LPS z biofilmu zaobserwowano dodatkowe oligosacharydy rdzeniowe (2180 Da, 1978 Da, 1847 Da, 2020 Da), których nie wykryto w LPS z hodowli płynnej. W przypadku *P. mirabilis* 1 B-m wykazano wpływ rozcieńczenia podłoża hodowlanego na budowę regionu rdzeniowego LPS (w LPS z hodowli w podłożu 10 x rozcieńczonym wykryto dodatkowe oligosacharydy rdzeniowe: 1987 Da, 1725 Da).

Lipopolisacharydy badanych szczepów *P. mirabilis* (1 B-m, 9 B-m) z hodowli planktonicznych i z biofilmu, w stężeniach 62,50-1 000 ng/ml, nie wykazywały istotnych statystycznie różnic w zdolności do stymulowania linii komórkowej THP-1 do wytwarzania TNF- α .

W pracy zbadano również wrażliwość wybranych szczepów *P. mirabilis* na dziesięć antybiotyków / chemioterapeutyków w hodowlach planktonicznych i biofilmowych za pomocą metody mikrorozcieńczeń w bulionie. Lekooporność szczepów *P. mirabilis* w biofilmie była 2-64 razy wyższa w porównaniu do form planktonicznych tych samych szczepów. Ponadto zaobserwowano stymulujący wpływ subinhibicyjnych stężeń niektórych antybiotyków i chemioterapeutyków na wzrost badanych szczepów w postaci biofilmu.

W toku przeprowadzonych badań wykazano, że w przypadku dwóch z trzech badanych szczepów *P. mirabilis* (1 B-m i 9 B-m), forma wzrostu bakterii (planktoniczna czy biofilmowa) miała wpływ na wytwarzanie LPS w komórkach bakterii.

Dominik Matusiak

Streszczenie w języku angielskim

Rod-shaped, Gram-negative bacteria of the genus *Proteus* most often cause urinary tract infections, especially among catheterised patients. These infections are associated with formation of the encrusted and usually multispecies biofilm on the catheter. Biofilm is a sessile form of bacterial growth – microorganisms are attached to the surface and surrounded by the extracellular matrix (ECM). Lipopolysaccharide is an integral component of Gram-negative bacterial cells and an important virulence factor of the bacteria. In many microorganisms the LPS structure plays a significant role in the biofilm formation process (e.g. adhesion to the surface).

The aim of this study was to compare LPSs of selected clinical *Proteus* spp. strains derived from planktonic and biofilm cultures.

In this study three *P. mirabilis* strains were selected (among five clinical *Proteus* spp. isolates), which showed most intensive growth on the polystyrene microtiter plates. These isolates belonged to O78 (*P. mirabilis* 1 B-m), O11a (*P. mirabilis* 9 B-m) and O8a,b (*P. mirabilis* 12 B-r) serogroups. In order to acquire substantial amounts of biofilm biomasses of these three strains, a glass bioreactor was built. This device was equipped with vertically aligned glass plates, which were covered with biofilm. After multiple biofilm cultures of the three selected strains in the bioreactor, lipopolysaccharides were isolated from the bacterial cells using a modified Westphal method. Afterwards, LPSs from biofilm cultures were compared with LPSs of homological isolates from planktonic cultures using SDS-PAGE, ELISA and Western blot techniques. The studies revealed some differences between LPSs samples from both types of the cultures – in case of *P. mirabilis* 1 B-m and *P. mirabilis* 9 B-m strains (partial OPS truncation and core structural changes in the samples from biofilm) and none for *P. mirabilis* 12 B-r strain (therefore excluded from further studies). Purpald assay revealed increased amounts of Kdo in the LPS *P. mirabilis* 1 B-m and *P. mirabilis* 9 B-m samples from biofilm (this suggested increase in the amount of low-weight LPS fractions with truncated OPS). Comparative analyses of *P. mirabilis* 1 B-m and *P. mirabilis* 9 B-m LPSs (OPS – NMR, lipid A – MALDI-TOF) from planktonic and biofilm cultures did not reveal differences regarding the type of culture. In case of *P. mirabilis* 1 B-m it was shown that dilution of the microbiological medium influenced the ribitol O-acetylation in the OPS (2,5 x higher O-acetylation was observed in LPS from planktonic culture in 10 x diluted medium in comparison to the LPS from the same type of the culture in non-diluted medium).

Chemical analyses of the core region of the LPSs (ESI HR) from two types of cultures showed changes in one *P. mirabilis* strain (9 B-m) – additional core oligosaccharides (2180 Da, 1978 Da, 1847 Da, 2020 Da) were observed in the LPS sample from biofilm (these oligosaccharides were absent in the LPS sample from planktonic culture). In case of *P. mirabilis* 1 B-m isolate dilution of the microbiological medium influenced the structure of the LPS core (in LPS from culture in 10 x diluted medium additional core oligosaccharides were detected: 1987 Da, 1725 Da).

Lipopolysaccharides of the selected *P. mirabilis* strains (1 B-m, 9 B-m) from the planktonic and biofilm cultures stimulated the THP-1 cell line (in concentrations 62,50-1 000 ng/ml) in a similar manner to produce TNF- α (no statistically significant differences were found).

Selected *P. mirabilis* strains were also tested for sensitivity to ten antibiotic / chemotherapeutic agents in planktonic and biofilm cultures using the microdilution method. *P. mirabilis* microbial resistance in biofilm was 2-64 times higher than in planktonic cultures. Additionally, positive effect of subinhibitory concentrations of some antibiotics / chemioterapeutics on biofilm formation was observed.

Performed studies proved that in case of two out of three investigated *P. mirabilis* strains (1 B-m and 9 B-m), the type of culture (planktonic or biofilm) could affect the LPS synthesis in the bacterial cells.

Dominik Matusiak