

## СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2015 В.С. Терещенко

Самарский государственный медицинский университет

Статья поступила в редакцию 12.10.2015

В статье описывается разработанный метод определения способности образовывать биоплёнки у грамотрицательных микроорганизмов на примере *Pseudomonas aeruginosa*.

**Ключевые слова:** биопленки, биопленкообразующая способность бактерий, резистентность, синегнойная палочка.

### ВВЕДЕНИЕ

Ключевой проблемой в лечении современных бактериальных инфекций является всё возрастающая резистентность микроорганизмов. Один из механизмов формирования этой устойчивости – способность образовывать биопленки [8].

Биопленки – это одна из форм существования бактерий, своеобразные сообщества микробов, внутри которых они живут, размножаются и, самое главное, общаются между собой [10]. Микробные клетки находятся внутри синтезированного ими же матрикса, который представлен по составу в основном полисахаридами, включениями белков, нуклеиновых кислот и липидов. Это обеспечивает механическую стабильность биопленок, опосредует их адгезию и взаимодействие [5]. Внутри этого матрикса бактериальные клетки обмениваются различными сигнальными молекулами, так называемыми аутоиндукторами, изменяя экспрессию генов, а таким образом и свойства биопленки. Этот феномен получил название «Чувство кворума (Quorum sensing)» [9].

Известно, что более 90% известных нам видов бактерий способны образовывать биопленки в принципе, а при хронических бактериальных инфекциях более чем три четверти штаммов демонстрируют данную способность [1]. Именно поэтому специалисты ведут спор о целесообразности определения формирования биопленок в клинической практике, однако, с нашей точки зрения, это необходимо для адекватного назначения терапии пациентам.

Существует несколько факторов, с которыми связывают повышение резистентности у пленкообразующих микроорганизмов. Во-первых, матрикс биопленки замедляет проникновение антибиотика к микробам, выполняя таким образом барьерную функцию. Кроме того, в глубоких слоях биопленки может изменяться значение рН,

влияя таким образом на эффективность антимикробного препарата. Наконец, в составе биопленок у бактерий могут экспрессироваться гены, не характерные для планктонных форм [3, 7].

В научной литературе представлены данные о разных методах определения биопленкообразующей способности бактерий, однако все они мало ориентированы на клиническую практику. Все методы можно разделить на две большие группы: статические и динамические [2]. Статические методы изучают бактерии в стационарной среде обитания. Во многих из них используются 96-луночные планшеты для иммуноферментного анализа, однако до сих пор нет четко стандартизированной методики, а некоторые имеют ряд неточностей и слабое научное обоснование. Динамические способы – это целая многообразная группа методик, объединенных тем, что они позволяют максимально приблизить условия культивирования биопленок к таковым *in vivo*. Однако они дороги и плохо применимы в условиях клинической лаборатории [4, 6, 11].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для разработки методики нами были взяты штаммы микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойной палочки), выделенные от пациентов с патологией ротовой полости. *Pseudomonas aeruginosa* – грамотрицательная палочковидная бактерия, условно патогенная для человека. Её выбор был обоснован тем, что данный микроорганизм очень активно образует биопленку, что удобно для стандартизации методики. Для выбора оптимального штамма нами был проведен сравнительный анализ штаммов *Ps. aeruginosa*, выделенных от пациентов с муковисцидозом и от больных со стоматологической патологией. Мы брали по 10 представителей каждого штамма и сравнивали образование ими биопленок на фотоэлектроколориметре. Выяснилось, что более агрессивно образуют микробные биопленки штаммы от пациентов с патологией ротовой полости, а значит, использование дан-

*Терещенко Василий Сергеевич, очный аспирант кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии. E-mail: basterser@yandex.ru*

ного штамма позволит нам более точно оптимизировать все остальные параметры системы.

Для выращивания культур использовали пептонный бульон, сваренный в соответствии с ГОСТ 20730-75 – одну из наиболее распространенных микробиологических сред, пригодную для выращивания широкого спектра микроорганизмов. Чистую культуру возбудителя вносили в бульон, затем инкубировали сутки при температуре 37°C. Затем полученный инокулят разводили стерильным 0,9% раствором NaCl в пропорциях 1 к 100 и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа. Планшет был выбран в качестве субстрата для адгезии микроорганизмов неслучайно. Во-первых, он есть в каждой лаборатории, во-вторых, он относительно дешев, в-третьих, использование такого типа планшетов позволяет с помощью предлагаемой методики проводить исследования различного дизайна. Количество вносимого инокулята выбрано с учетом емкости лунок планшета: нами использовались модели с объемом лунок 200 мкл. Половину лунки заполняли, потому что при внесении большего количества инокулята становилось невозможным качественно отмыть лунки от остатков красителя.

После внесения микроорганизма в лунки планшет инкубировался при температуре 37°C. В качестве эксперимента время инкубации выбиралось различным: 4, 8, 24 и 48 часов. Оптимальным оказалось время в 24 часа, что соответствует представлениям о стадиях образования биопленок. При помещении инокулята в лунки в течение 4 часов микроб проходит стадию неспецифической адгезии, к 8 часам – специфической адгезии, и начинается формирование двухмерной биопленки, которая достигает структуры зрелой биопленки к 24 часам. После 24 часов инкубации в лунках планшета происходит постепенная деградация биопленок, поэтому данные, полученные через 48 часов, не репрезентативны.

Следующим этапом являлось внесение красителя в лунки планшета, после экстракции оттуда остатков бульона. Краситель должен соответствовать нескольким условиям: он должен прокрашивать матрикс биопленок, состоящий в основном из полисахаридов; его цвет должен соответствовать длине волне фильтра, используемого в фотоэлектрориметре; остатки красителя в лунках можно легко удалить промыванием этих лунок, без повреждения биопленок. Исходя из перечисленных условий, нами был выбран 0,1% спиртовой раствор фуксина: его цвет спектр соответствует фильтру с длиной волны 490 нм.

Время экспозиции красителя было подобрано опытным путем. Мы оставляли раствор фуксина в лунках на 5, 15, 30, 45, 60, 75 и 90 минут. Минимальное время, понадобившееся для прокрашивания биопленки, составило 45 минут.

Дальнейшее увеличение времени экспозиции не оказало влияния на последующий результат.

Краситель экстрагировался из лунок после 45 минут, затем требовалось промыть лунки от остатков фуксина. Для этого мы сравнили эффективность промывания стерильной водой в ампулах для инъекций и фосфатным буфером. В результате фосфатный буфер удалял остатки красителя со стенок лунок более полно, нежели вода.

Кратность промывания также определялась опытным путем. Однократного и двукратного промывания не было достаточно как при использовании воды, так и при использовании буфера. Трехкратного промывания фосфатным буфером оказалось достаточно для полного удаления остатков красителя, в то время как при использовании воды количество необходимых промываний составило минимум 5 раз.

После экстракции красителя из лунок и трехкратного промывания в лунки вносили этиловый спирт. Этиловый спирт разрушает окрашенную биопленку, высвобождая таким образом краситель, оставшийся в ней. Мы использовали 70% и 96% медицинский спирт. Время экспозиции составляло 5, 15, 30, 45, 60, 75 и 90 минут. Наиболее подходящим оказалось сочетание 96% этилового спирта и времени экспозиции 45 минут: за это время спирт полностью разрушал биопленку и позволял обработать полученные данные.

Последний этап определения биопленкообразующей способности бактерий – оценка полученных данных. Для этого планшет с окрашенным спиртом в лунках помещался в фотоэлектрориметр. Количественной оценкой степени образования биопленки служили значения оптической плотности. Таким образом, чем интенсивнее образовывалась биопленка, тем больше красителя она могла впитать, тем больше были значения оптической плотности. За ноль может быть принято значение оптической плотности в первой лунке, оставленной для контроля, либо значение оптической плотности по воздуху, это будет зависеть от задач исследования.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, разработанная методика позволяет определить способность к образованию биопленок в условиях лаборатории. Несмотря на то, что в нашей работе в качестве микроорганизма использовалась *Ps. aeruginosa*, метод перспективен для определения биопленкообразующей способности и у других грамотрицательных бактерий при создании оптимальных условий роста.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. 2010.

- Т. 2. №. 3. С.4-15.
2. *Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В.* Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. №. 1. С.17-22.
  3. *Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В.* Проблемы в медицине, связанные с бактериальными плёнками // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. №. 4. С. 268-275.
  4. *Coenye T., Nelis H.J.* In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation // Journal of microbiological methods. 2010. Т. 83. №. 2. С.89-105.
  5. *Flemming H.C., Wingender J.* The biofilm matrix // Nature Reviews Microbiology. 2010. Т. 8. №. 9. Pp.623-633.
  6. *Hall-Stoodley L. et al.* Establishment of experimental biofilms using the modified robbins device and flow cells // Environmental Monitoring of Bacteria. – Humana Press, 1999. С. 307-318.
  7. *Mah T.F. et al.* A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance // Nature. 2003. Т. 426. №. 6964. Pp.306-310.
  8. *Mah T.F.C., O'Toole G.A.* Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents // Trends in microbiology. 2001. Т. 9. №. 1. Pp.34-39.
  9. *Miller M.B., Bassler B.L.* Quorum sensing in bacteria // Annual Reviews in Microbiology. 2001. Т. 55. №. 1. Pp.165-199.
  10. *Parsek M.R., Greenberg E.P.* Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms // Trends in microbiology. 2005. Т. 13. №. 1. Pp.27-33.
  11. *Şeker S., Beyenal H., Tanyolaç A.* The effects of biofilm thickness on biofilm density and substrate consumption rate in a differential fluidized bed biofilm reactor (DFBBR) // Journal of biotechnology. 1995. Т. 41. №. 1. Pp.39-47.

### A METHOD OF DETECTING BIOFILM-FORMING ABILITY IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA

© 2015 V.S. Tereshchenko

Samara State Medical University

The article describes methods for determining the ability to form biofilms in Gram-negative microorganisms on the example of *Pseudomonas aeruginosa*.

**Keywords:** biofilms, biofilm-forming ability of bacteria, resistance, *Pseudomonas aeruginosa*.