

# Микробиология

УДК: 619:579 861.2:618.19-002:636.2

## БИОПЛЕНКА МИКРООРГАНИЗМОВ – АПРОБИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**НУРУЗОВА ЗУХРА АБДУКАДЫРОВНА**

*доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой  
Микробиологии, вирусологии и иммунологии Ташкентской  
медицинской академии. Город Ташкент Республики Узбекистан.*

*ORCID ID 0000-0002-2151-7928*

**БАЙМАТОВ РАВШАН АЛИТЖАНОВИЧ**

*магистр по направлению «Бактериология и вирусология»  
Ташкентской медицинской академии. Город Ташкент  
Республики Узбекистан. ORCID ID 0000-0002-4371-1094*

**ТОЛИПОВА ГУЛХАЁХОН КОМИЛЖОН КИЗИ**

*ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и  
иммунологии Ташкентской медицинской академии. Город Ташкент  
Республики Узбекистан. ORCID ID 0000-0003-1497-7114*

### АННОТАЦИЯ

*В статье анализируется последний 10-летний обзор литературы об структуре, диагностике по уже наложенным методам исследования биопленки микроорганизмов в экспериментальных условиях. Дан полный объем информации результатов исследований ученых различных стран работавших над этой проблемой. Раскрыты способы получения биопленок в экспериментальных условиях.*

**Ключевые слова:** *биопленка, устойчивость к антибиотикам, методология биопленок.*

**MICROBIAL BIOFILM – PROVEN RESEARCH METHODS****NURUZOVA ZUKHRA ABDUKADYROVNA**

*doctor of medical sciences, professor managing department of Microbiology, virology and immunology of the Tashkent medical academy. City of Tashkent of the Republic of Uzbekistan.*

ORCID ID 0000-0002-2151-7928

**BAYMATOV RAVSHAN ALITZHANOVICH**

*master in the Bacteriology and Virology direction of the Tashkent medical academy. City of Tashkent of the Republic of Uzbekistan.*

ORCID ID 0000-0002-4371-1094

**TOLIPOVA GULKHAYOKHON KOMILZHON KIZI**

*assistant to department of microbiology, virology and immunology of the Tashkent medical academy. City of Tashkent of the Republic of Uzbekistan. ORCID ID 0000-0003-1497-7114*

**ABSTRACT**

*This article analyzes the latest 10-year review of the literature on structure, diagnostics using already imposed methods for studying the biofilm of microorganisms under experimental conditions. The article provides a full range of information from the research results of scientists from various countries working on this problem. Particularly well disclosed are methods for producing biofilms under experimental conditions.*

**Key words:** *biofilm, antibiotic resistance, biofilm methodology.*

**МИКРООРГАНИЗМЛАР БИОПЛЕНКАСИ - АНИҚЛАШНИНГ  
ЎРГАНИЛГАН УСУЛЛАРИ****НУРУЗОВА ЗУХРА АБДУКАДЫРОВНА**

*тиббиёт фанлари доктори, профессор, Тошкент тиббиёт академиясининг микробиология, вирусология ва иммунология кафедраси мудири. Тошкент шаҳри. Ўзбекистон Республикаси.*

ORCID ID 0000-0002-2151-7928

**БАЙМАТОВ РАВШАН АЛИТЖАНОВИЧ**

*Тошкент тиббиёт академиясининг «Бактериология ва вирусология» йўналиши бўйича магистри. Тошкент шаҳри.*

*Ўзбекистон Республикаси. ORCID ID 0000-0002-4371-1094*

**ТОЛИПОВА ГУЛҲАЁХОН КОМИЛЖОН КИЗИ**

*Тошкент тиббиёт академиясининг микробиология, вирусология ва иммунология кафедраси ассистенти. Тошкент шаҳри. Ўзбекистон Республикаси. ORCID ID 0000-0003-1497-7114*

**АННОТАЦИЯ**

*Мақолада микроорганизмларнинг биопленкасини экспериментал шароитда йўлга қўйилган диагностика усуллари, биопленкани ҳосил бўлиш хусусиятлари ҳақидаги охириги 10 йиллик адабиётлар таҳлили тақдим этилган. Юқоридаги долзарб муаммо устида илмий изланишлар олиб борган турли хорижий олимлар текширувлари натижалари тўғрисидаги тўлиқ маълумотлар келтирилган. Айниқса экспериментал шароитда биопленкани ҳосил қилиш усуллари яхши очиқ берилган.*

**Калит сўзлар:** *биопленка, антибиотикорезистентлик, биопленка методологияси*

**Актуальность.** Биопленки представляют большую проблему в медицине. Они могут образовываться как на неповрежденных участках тела человека, так и в ранах, покрывать поверхности катетеров, искусственных имплантов, протезов и т.д. - [18]. Современные меры борьбы с микроорганизмами, испытанные ранее на одиночных клетках, практически не действуют на многоклеточные микробные формирования, как прикрепленные к субстрату, так и подвижные. В результате чего большое количество бактериальных заболеваний может переходить в хроническое состояние или даже

усугубится. Для изучения биопленок используются нижеуказанные методы исследования.

Существует достаточно большое количество методов, позволяющих провести визуализацию сформировавшихся бактериальных пленок. К методам, которые визуализируют ультраструктуру микробных сообществ, можно отнести электронную микроскопию и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (CLSM) - [19]. Другие методы основаны на сорбции молекул красителя на структурах биопленки, с последующей их отмывкой (десорбцией) в органические растворители. Такой способ индикации биопленок наиболее часто используется в статических методах культивирования микробных биопленок и позволяет дать условную количественную характеристику образовавшимся микробным сообществам, т.е. чем больше образуется матрикс биопленки, тем больше красителя сорбируется на его поверхности и тем выше оптическая плотность образца.

Измерение биолюминесценции (BPI) – достаточно новый метод изучения и детекции биопленок, который используется как *in vitro*, так и *in vivo*. Соколова Т.Н., использовавшая этот метод в своих исследованиях, основывалась на том что, при искусственном введении в бактерии плазмид, ответственных за синтез люминесцирующего белка, проводится визуализация как адгезированных бактерий, так и матрикс биопленки. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) также стал сравнительно недавно использоваться для изучения биопленок в медицине (данный метод часто совмещается с методом CLSM). Метод гибридизации применяют для детекции и определения расположения специфических мРНК в клетках, образующих биопленки, что позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в бактериях - [18]. С помощью этого метода была определена

неоднородность бактерий в биопленке и выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции во время воздействия летальных для основной массы клеток факторов - [9]. Также ученым И.В. Чеботарь были проведены исследования по новому методу количественного учета кокков в надклеточных образованиях — кластерах и биопленке. Для получения стафилококковой биопленки использовали стерильные полимерные чашки Петри диаметром 40 мм, бульон Мюллера-Хинтона (Becton, Dickinson and Company), содержащего 1% глюкозы, культуру стафилококков, раствор Хенкса, для фиксации использовали 10% раствор формалина на забуференной (pH=7,2-7,4) дистиллированной воде, окрашивали 1% раствором кристаллвиолета. Полученные препараты рассматривали под микроскопом при увеличении в 300-500 раз без иммерсии или с масляной иммерсией. Цифровые изображения бактерий получали с помощью видеокамеры DCM310 (Scope Tec) и сохраняли в форматах bmp или jpeg. Для подсчета бактерий на изображениях использовали специально написанную для этого программу - [5]. Программа позволяет подсчитать количество стафилококков на изображении независимо от того, расположены ли они одиночно или находятся в составе кластеров, адгезированных к поверхности, или локализованы в составе биопленки. Кроме этого, программа дает возможность определить количество кластеров, состоящих из одинакового числа бактерий, а также построить диаграмму, отражающую соотношения «кластер/количество бактерий» в этом кластере. Разработанный метод позволяет вычислить абсолютные количества бактерий: зная оптические характеристики микроскопа (диаметр поля зрения) или используя микроскопические стандарты длины, можно подсчитать плотность бактерий на единице площади поверхности. Программа позволяет экспортировать полученные данные в стандартные приложения

Excel и PRISMA для последующей статистической обработки - [19]. В последние годы всё больше учёных занимаются методами воздействия на биопленку. Учеными Косинец А.Н., Фролова А.В., Булавкин В.П., было апробировано оригинальное лекарственное средство растительного происхождения «ФитоМП» из маклей мелкоплодной и подорожника большого при лечении пациентов с раневой инфекцией. Использование присыпки при соотношении компонентов «маклея / подорожник» ÷ 2:1 снижает обсемененность ран стафилококком и очищает раневую поверхность на 3-и сутки, способствует сокращению I фазы раневого процесса и сроков госпитализации пациентов на 2,21 койко-дня в отличие от получающих традиционные антибактериальные средства. Получение мономикробной биопленки проводили на нитроцеллюлозной мембране. Индикацию биопленки, определение способности объекта разрушать экзополимерный матрикс проводили с помощью световой и конфокальной микроскопии - [18].

Лабораторные и экспериментальные исследования показали, что из рассмотренных растительных композиций состав «маклея мелкоплодная / подорожник большой» («ФитоМП») сочетает в себе выраженный антимикробный, противовоспалительный и ранозаживляющий эффекты - [9]. Для изучения влияния различных агентов на формирование и рост биопленки учеными Сухина М.А. и Калашникова И.А. использовали резистентные клинические штаммы микроорганизмов, полученные от пациентов с гнойно-воспалительными осложнениями после оперативных вмешательств - [16]. В качестве ингибирующих факторов были использованы раствор для обработки ран, кожный антисептик, фильтраты 19 клинических штаммов лактобацилл и штамм *Lactobacillus plantarum* из пробиотика «Лактобактерин сухой» (ФГУП «НПО «Микроген», Нижний Новгород; серия 46/06-1209) в качестве эталонного штамма-производителя

бактериоцинов. Биопленки на стеклянных носителях инкубировали при 37°C 48 часов и визуализировали с использованием микроскопа, обеспечивающего увеличение  $\times 960$  - [6]. Мономикробные биопленки *S. aureus* ATCC 6538 и *P. aeruginosa* ATCC 9027 были получены на нитроцеллюлозной мембране. Для визуализации матрикса использован водный раствор Конго красного с добавлением 10% раствора Твин 80 и 10% карболового фуксина. Непосредственно перед проведением эксперимента готовили рабочую суспензию матрикса - [17]. Затем определяли способность антимикробного агента разрушать матрикс. Также количественная характеристика разрушающей способности антимикробного агента оценена по концентрации (К) Конго красного, высвободившегося при разрушении комплекса красителя с компонентами экзополимерного матрикса. В качестве контроля использован физиологический раствор. Способность антимикробного агента разрушать экзополимерный матрикс биопленки выявлена с помощью световой и конфокальной микроскопии - [9].

Исследование биопленок при помощи метода ультратонких срезов. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Особенность подготовки препаратов для проведения электронно-микроскопического анализа методом ультратонких срезов заключалась в сохранении исходной структуры и пространственного расположения микробных клеток в исследуемой биопленке. Для этого участки бактериального роста, вырезанные вместе с агаром, предварительно фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида на буфере Хенкса (pH=7,2) при температуре 4°C, наливая фиксатор в основание агаровой пластинки, чтобы не нарушить целостность и поверхностные структуры микробных сообществ. Через 24 ч на поверхность фиксированных образцов наносили несколько капель 0,5%-ного раствора агарозы, расплавленной на водяной бане и охлажденной до

30°C. Заключенные в агарозный гель пробы промывали дистиллированной водой и подвергали вторичной фиксации в 1%-ном водном растворе четырехоксида осмия в течение суток при температуре 4°C, полностью помещая их в раствор фиксатора. Для обезвоживания образцы целиком погружали в растворы спиртов возрастающей концентрации по стандартной методике и заключали в смолу. Для устранения ошибок из заливочных блоков делали заготовки в виде пирамидок на пирамитоме (LKB, Швеция), что обеспечивало возможность правильно ориентировать исследуемый объект и оценивать местоположение зон бактериального роста относительно друг друга при дальнейшем изготовлении ультратонких срезов. Окраску ультратонких срезов, полученных из зон бактериального роста культур, проводили по общепринятому методу. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100C (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). В опытах использовали паспортизированные тест-культуры микроорганизмов *Mycobacterium* B5 № 12 – штамм для контроля качества дезинфекции относится к IV группе патогенности. Микроорганизмы культивировали на среде Левенштейна-Йенсена при 37°C, фенотипические признаки бактерий определяли общепринятыми методами. В опытах использовали препарат «Йодлукман», общая концентрация входящего в состав композиции йода составляет 13,5%, препарат используется как 100%, так как на протяжении 5 лет хранения не теряет своей активности, а концентрация йода остается неизменной - [19, 9]. Для получения репрезентативной информации исследование проводили методом случайного отбора полей зрения оптического микроскопа «H604 Trinocular» (Unico, США), стереоскопического микроскопа «МС-1 Стерео» (Биомед, Россия),

настолярного сканирующего электронного микроскопа «ТМ 3030 plus» (Holland).

Данные экспериментов обрабатывали методом статистического анализа с использованием критерия достоверности Стьюдента, считая различия достоверными при  $p \leq 0,05$ . При исследовании биопленок выявляли седиментацию; фиксацию; коагрегацию (монослой, межклеточных связей); рост микроколоний; формирование кластеров и архитектоники биопленки; дисперсию. На начальном этапе (6–8 ч культивирования) наблюдали седиментацию и адгезию вегетативных форм бактерий к исследуемой поверхности. Причем выявляли как отдельно расположенные бактерии, так и несколько бактериальных клеток, объединенных матриксом в цепочки. Через 18–24 ч культивирования формировался межклеточный матрикс, через 24–36 ч – уплотненные участки в виде диффузного слоя на поверхности покровного стекла. При культивировании в течение 48–120 ч были выявлены плотно упакованные и объединенные межклеточным матриксом бактерии, прикрепившиеся к поверхности и образующие микроколонии различного размера, состоявшие из закрытых межклеточным матриксом бактериальных клеток. В биопленках выявлялся плотный слой диффузного вещества, на периферии микроколоний выявлялись палочковидной формы бактерии. При воздействии препарата происходило разрушение межклеточного матрикса, целостность клеток, находившихся под биопленкой, нарушалась, что сопровождалось увеличением светопреломления и снижением оптической плотности (density, D). В частности, исследуемые культуры микроорганизмов *Mycobacterium B5* по величине оптической плотности ( $D = 0,699–1,510$ ) были отнесены к сильным продуцентам биопленок, так как оптическая плотность выше контрольной, более чем в 4 раза. После воздействия препарата «Йодлукман» культуры микроорганизмов

были отнесены к слабым продуцентам биопленок, так как оптическая плотность ( $D \leq 0,197$ ) выше контрольной менее чем в 2 раза. Результаты собственных исследований, сопоставление и анализ ранее опубликованных работ позволяют заключить, что способность микобактерий продуцировать биопленки приводит к смене фенотипических признаков популяции, переход в «некультивируемое состояние», персистенцию в организме восприимчивых видов и окружающей среде - [14, 19]. При формировании биопленок происходит адгезия микобактерий, синтез экзополисахаридного матрикса - [9]. Биопленки микобактерий представляют собой многоклеточные сообщества микроорганизмов, способные переносить более чем в 50 раз минимальные ингибиторные концентрации противотуберкулезных препаратов, например изониазида и рифампицина - [6]. Морфофункциональная стабильность биопленок способствует конкурентному выживанию в различных экологических нишах и защищает популяцию лекарственно устойчивых микобактерий - [8].

Учитывая, что биопленки – превалирующая форма существования микроорганизмов, перспективным направлением комплексной терапии и профилактики инфекционной патологии является эрадикация биопленок. Для предотвращения формирования биопленок перспективными признаны препараты, снижающие адгезию бактериальных клеток и содержащие биоциды, проникающие в матрикс - [14].

Были проведены исследования В.С. Терещенко в 2014 году по определению эффективности подавления кларитромицином и его генериками способности к биопленкообразованию у *Pseudomonas aeruginosa*. Для этого в работе были выбраны пленкообразующие штаммы *P. aeruginosa* (штамм 1 – синегнойная палочка, выделенная от пациентов со стоматологической патологией, штамм 2 – от

пациентов с муковисцидозом). Способность к образованию биопленок определяли на пластиковых планшетах для иммуноферментного анализа. Для выращивания культур использовали пептонный бульон, суточные культуры разводили 1 к 100, вносили по 100 мкл в лунки. Кларитромицин и его генерики вносили непосредственно после данного этапа, а также через 4 и через 8 часов после начала инкубации для изучения влияния антибиотика на способность образовывать биопленку на разных стадиях её формирования. Интенсивность окрашивания биопленки оценивали на фотоколориметре при длине волны 490 нм. - [14]. Длина волны фильтра была выбрана в соответствии с использованным красителем. Количественной оценкой степени образования биопленки служили значения оптической плотности. В результате работы выявлено, что ВЕС кларитромицина, способная подавить рост биоплёнок *P. aeruginosa*, находится в пределах от 0,04 до 0,60 мкг/мл, а его генерика – в пределах от 0,50 до 500 мкг/мл и более. Оптимальная концентрация кларитромицина и его генерика для подавления биопленкообразующей способности *P. aeruginosa* зависит от штамма и времени внесения. Выяснилось, что при добавлении антибиотика и его генерического препарата в лунки непосредственно после внесения бактерий, ВЕС кларитромицина составила 0,30 и 0,08 мкг/мл для штаммов 1 и 2 соответственно, а генерика – более 500 мкг/мл в обоих случаях. При внесении антибиотика через 4 часа ВЕС кларитромицина имели значения 0,60 и 0,04 мкг/мл для 1 и 2 штаммов, а генерик показал более высокие значения – 1 мкг/мл и более 500 мкг/мл соответственно. Через 8 часов после внесения ВЕС кларитромицина для штамма 1 составила 0,60 мкг/мл, а для штамма 2 – 0,04 мкг/мл, генерика – 0,5 мкг/мл и более 500 мкг/мл соответственно - [8].

**Выводы:** В статье указаны методы, которые были апробированы для изучения биопленок и их свойств в течении 10 лет, судя по полученным данным еще много методов не было использовано и суть биопленок изучена еще не в полном объеме. Можно судить, что тема остается актуальной и по сей день. Нашей целью является изучение биопленок микроорганизмов, штаммы которых распространены в Республике Узбекистан, используя уже апробированные методы исследования и возможно поиск новых методов воздействия на биопленку микроорганизмов.

#### **Список литературы:**

1. Косинец А.Н., Фролова А.В., Булавкин В.П., Окулич В.К. Антибиотикорезистентность. новые возможности антибактериального воздействия//Вестник ВГМУ, 2014, ТОМ 13, №2 2.
2. Ленченко Е.М., Бингхонг Ху, Удавлиев Д.И. и др. Исследование биопленок микобактерий при воздействии йодсодержащего препарата Вестник КрасГАУ. 2018. № 3 С.54-57
3. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г. Ультраструктура биопленок при внутривидовом и межвидовом взаимодействии условно патогенных бактерий//Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал), 2014, № 1 С.1-11
4. Рахматулина М.Р., Нечаева И.А. Биопленки микроорганизмов и их роль в формировании резистентности к антибактериальным препаратам//Вестник дерматологии и венерологии 2015г.
5. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальная биоплёнка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина// Журн. Микробиол. 2011; Т3: С.99-109.
6. Сухина М.А., Калашникова И.А., Кашников В.Н. и др. Влияние антибактериальных веществ на рост биопленки клинических изолятов// Колопроктология, 2018, №2
7. Соколова Т.Н. Микробные биопленки и способы их обнаружения// Журнал Гродненского государственного медицинского университета № 4, 2014 г. С.15-18
8. Терещенко В.С., Жестков А.В., Лямин А.В. Определение эффективности подавления кларитромицином и его генериками способности к биопленкообразованию у *Pseudomonas aeruginosa* //Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал), 2014, № 3 С.1-3

9. Фролова А.В., Сенькович С.А., Плотников Ф.В. Новые антимикробные агенты, способные разрушать матрикс биопленок// Вестник Смоленской государственной медицинской академии 2015 г., Т. 14, № 1 С. 45-50

10. Харсеева Г. Г., Фролова Я. Н., Миронов А. Ю. Биопленки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса// Успехи современной биологии 2015 г. том 135, № 4, С. 346–350

11. Чеботарь И.В., Таланин Е.А., Кончакова Е.Д., Новый метод количественного учета кокков в надклеточных образованиях — кластерах и биопленке СТМ 2010г №3 С.14-16.

12. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий // Клин. Микробиол. и антимикробхимиотер. 2012. Т. 14. №1: С. 51-58.

13. Bester, E. Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates / E. Bester [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, N 4. – P. 1189–1197.

14. Coenye T., Nelis H.J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. J. Microbiol. Meth. 2010. 83(2): P.89-105.

15. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections /L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11, N 7. – P. 1034–1043.

16. Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R. Quorum sensing and phytochemicals // International journal of molecular sciences. – 2013. – V. 14. – №6. – P. 12,60,712,619.

17. Simoes M., Bennett R. N., Rosa E. A. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms// Natural product reports. – 2009.– V. 26. – №6. – P. 746-757.

18. Tetz G. V., Artemenko N. K., Tetz V. V. // Antimicrob. Agents Chemiother. – 2009. – Vol. 53, N 3. – P. 1204–1208.

19. Wojnicz D., Kucharska A. Z., SokolLetowska A. et al. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic Escherichia coli//Urol Res. – 2012. – №40. – P. 683–697.