

В. В. Алексейкова, Б. Б. Н. Фершиши
РАЗРАБОТКА МЕТОДА УСКОРЕННОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *STREPTOCOCCUS* В
ПОЛИСТИРОЛОВОМ ПЛАНШЕТЕ

Научный руководитель: канд мед. наук, доцент С. А. Сенькович

Кафедра клинической микробиологии

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск

Резюме. В настоящее время микробные биопленки представляют собой интерес в клинической медицине, поскольку являются одним из факторов устойчивости микроорганизмов к системе иммунитета человека и антибактериальной терапии. Бактерии рода *Streptococcus* являются возбудителями многих гнойно-септических заболеваний. Существующие на данный момент методы получения биопленки для исследования её не находят широкого применения в клинике из-за временного фактора – длительного периода формирования стрептококками биопленки. Цель исследования: разработать метод ускорения образования стрептококками биопленки. Разработан метод ускоренного формирования биопленки, основанный на предварительном внесении в лунки полистиролового планшета специальной добавки. Прирост массы биопленки разными штаммами стрептококков за сутки составил от 23% до 83%.

Ключевые слова: биопленка, микроорганизм, стрептококк, инфекции.

Resume. Actually microbial biofilms are of interest in clinical medicine because they are one of the factors of resistance of microorganisms to the system of human immunity and antibacterial therapy. Bacteria of the genus *Streptococcus* are the causative agents of many purulent-septic diseases. The currently existing methods of obtaining a biofilm for the study of it do not find application in the clinic in view of the time factor. The aim of study is to develop a method for accelerating the formation of *Streptococcus* biofilms. The method is based on the preliminary application of a special additive into the wells of polystyrene plate and the subsequent determination of the formation of a biofilm by a standard plate method using gentian-violet. Analysis of the results showed that the increase in weight of biofilm per day was from 23% to 83% depending on the test strain of *Streptococcus*.

Keywords. biofilm, microorganism, streptococcus, infections.

Актуальность. К настоящему времени признано, что большинство микроорганизмов в естественных условиях существуют в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ - биопленок [1]. Показано, что бактериальные биопленки ответственны за этиологию и патогенез многих острых и, особенно, хронических инфекций. В составе биопленки бактерии в сравнение с планктонными формами проявляют новые свойства, такие как метаболическая кооперация, повышенная устойчивость к факторам системы иммунитета и высокая резистентность к антибактериальным препаратам [2]. Образование биоплёнок - это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов: адгезии клеток на поверхности и перераспределения клеточной массы; активного деления клеток для создания клеточных кластеров; образования экзополимерного слизистого матрикса. [3]

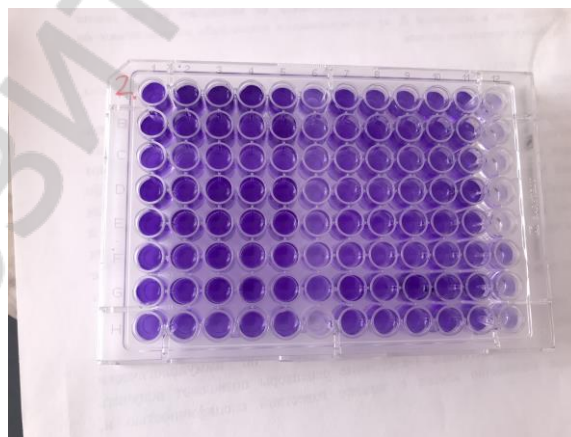
В этиологии ряда гнойно-септических заболеваний значительную роль играют бактерии рода *Streptococcus*. Среди различных штаммов стрептококков обнаруживаются как образующие, так и не образующие биопленку. К настоящему времени разработано большое количество методов культивирования биопленок *in vitro* [4], однако в клинико-лабораторной практике эти методы не находят широкого

применения. Важной причиной этого является временной фактор, поскольку рост и созревание биопленки стрептококков составляет не менее 3 суток. В связи с этим, появляется необходимость разработки методов ускорения формирования биопленки стрептококками.

Цель: Разработать метод ускорения образования стрептококками биопленки.

Материал и методы. Метод усиления образования биопленки разрабатывали и апробировали с использованием 8 клинических изолятов бактерий рода *Streptococcus* (5 штаммов *S. oralis* и 3 штамма *S. mutans*), выделенных стандартными методами на базе микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии», расположенном на базе Витебской областной клинической больницы.

Усиление образования биопленки производили посредством предварительного внесения в лунки планшета полученной нами добавки, стимулирующей формирование биопленки, которая в настоящее время патентуется. Определение способности микроорганизмов к образованию биопленки производили стандартным планшетным методом с использованием кристаллического фиолетового. Для этого в асептических условиях с помощью бактериологической петли готовили взвесь исследуемого изолята на бульоне Мюллера-Хинтона с оптической плотностью 0,5 единиц McFarland, что соответствует конечной концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Далее в лунки полистиролового планшета вносили по 0,15 мл полученной взвеси бактерий. На каждый штамм стрептококка отводили по 6 лунок с внесенной ранее добавкой и 5 лунок без добавки. Отрицательным контролем служили лунки с добавкой 0,15 мл бульона Мюллера-Хинтона без бактерий. Затем герметично закрытый планшет инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов в капнофильных условиях.



1-5 лунки – с внесенной предварительно добавкой, 7-11 – без добавки.

Рисунок 1 – Готовый планшет для определения оптической плотности биопленки.

Определение количества биопленки в лунках планшета производили спектрофотометрически, при окраске раствором кристаллического фиолетового. С помощью автоматической мойки добавляли в лунки по 0,1 мл дистиллированной воды, после чего лунки четырехкратно промывали, используя 0,2 мл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. Затем биопленку фиксировали

путем добавления в лунки по 0,18 мл 2,5% раствора глютаральдегида (экспозиция в течение 5 минут). Далее планшет четырехкратно промывали, и вносили по 0,2 мл 0,25 % раствора кристаллического фиолетового на 5 минут, после чего планшет снова четырехкратно промывали. Затем в лунки добавляли по 0,25 мл 33 % раствора уксусной кислоты (экспозиция при комнатной температуре 10 минут). Планшет (рисунок 1) помещали в многоканальный спектрофотометр, где при длине волны 620 нм определяли оптическую плотность раствора в лунках.

Полученные на спектрофотометре значения оптической плотности ($E_{оп}$), переводили в вес микробной биопленки из расчета микрограмм на одну лунку 96-луночного планшета для ИФА. Для вычислений мы использовали формулу (1):

$$X = 226,28 * E_{оп}^{1,28} \quad (1)$$

где: X – искомая масса биопленки в лунке

$E_{оп}$ – оптическая плотность лунки

Количественную оценку прироста биопленки в лунках с добавкой производили относительно лунок без добавки в процентах.

Результаты и их обсуждение

Прирост массы биопленки за 24 часа, определенный для 6 разных штаммов стрептококка в лунках с добавкой в сравнении с чистыми лунками составил от 23% до 83%. В лунках, где присутствовали добавка и чистая среда, рост бактерий отсутствовал. У 2 исследованных изолятов стрептококка не наблюдалось образования биопленки как в чистых лунках планшета, так и в лунках с добавкой. Наибольший прирост массы биопленки наблюдался у штаммов с изначально низкой способностью к образованию биопленок.

Выводы:

1. Разработан метод ускорения образования биопленки стрептококков в полистироловом планшете. Прирост массы биопленки при инкубации в течение суток составил 23-83%.

2. Определено, что у штаммов с изначально низкой способностью к формированию биопленки наблюдался наибольший прирост массы биопленки. Изоляты, не способные к образованию биопленки в стандартных условиях, не образовывали ее и при использовании добавки.

3. Данный метод можно использовать в лабораторной практике для сокращения времени образования биопленки.

Литература.

1. Мюллер, Х. П. Микробиология полости рта / Х. –П. Мюллер // Пародонтология: науч. ред. изд. / Х. П. Мюллер пер. на рус. яз. проф. А. М. Политун – 2004 – С. 30 –35
2. Costerton, J. W., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg. // Science – 1999 – vol. 284 – pp.1318-1322
3. Особенности формирования микробных биопленок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок на желчных конкрементах / Ю.С. Винник, Е.В. Серова, Р.И. Андреев и др. // Журнал «Научное обозрение. Медицинские науки» - 2014 - №1 - С. 62 - 62
4. Coenye, T. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. / T. Coenye, H.J. Nelis // Journal of Microbiological Methods – 2010 - vol. 83 - pp. 89-105.