

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПЛЕНОК МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЙОДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА

Е.М. Lenchenko, Hu Binghong,
D.I. Udavliev, Yu.A. Vatnikov

THE RESEARCH OF MYCOBACTERIA BIOFILMS UNDER THE INFLUENCE OF IODINATED PREPARATION

Ленченко Е.М. – д-р вет. наук, проф. каф. ветеринарной медицины Московского государственного университета пищевых производств, г. Москва. E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru

Ху Бинхун – асп. Департамента ветеринарной медицины аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов, г. Москва. E-mail: khuyennonggb@gmail.com

Удавлиев Д.И. – д-р биол. наук, проф. каф. ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности Московского государственного университета пищевых производств, г. Москва. E-mail: udavliev-59@yandex.ru

Ватников Ю.А. – д-р вет. наук, проф., директор Департамента ветеринарной медицины аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов, г. Москва. E-mail: vatnikov@yandex.ru

Lenchenko E.M. – Dr. Vet. Sci., Prof., Chair of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Productions, Moscow. E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru

Hu Binghong – Post-Graduate Student, Department of Veterinary Medicine, Agrarian Institute of Technology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow. E-mail: khuyennonggb@gmail.com

Udavliev D.I. – Dr. Biol. Sci., Prof., Chair of Veterinary and Sanitary Examination and Biological Safety, Moscow State University of Food Productions, Moscow. E-mail: udavliev-59@yandex.ru

Vatnikov Yu.A. – Dr. Vet. Sci., Prof., Director, Department of Veterinary Medicine, Agrarian Institute of Technology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow. E-mail: vatnikov@yandex.ru

В статье представлены данные по изучению морфологических и денситометрических особенностей формирования микобактериями биопленок до и после воздействия йодсодержащего препарата «Йодлукман». В опытах использовали культуры микроорганизмов *Mycobacterium B5*, которые культивировали на среде Левенштейна-Йенсена при 37 °С. Формирование биопленок микобактерий исследовали до и после воздействия препарата «Йодлукман». Оптическую плотность жидкости определяли в фотометрическом анализаторе. В лунки вносили по 200 мкл культур микроорганизмов и культивировали 24 ч при 37 °С. В каждую лунку вносили по 200 мкл 0,1 %-го раствора кристаллвиолета. Через 20 мин лунки трижды промывали буферным раствором, подсушивали и фиксировали в течение 30 мин 200 мкл 95° этилового спирта. Для изучения этапов формирования биопленок применяли способ культивирования бактерий в МПБ. Для контроля роста и развития бактерий использовали окраску 1,0 %-м водным раствором метиленового синего. Наряду с общепринятым методом применяли фиксацию парами 25,0 %-го раствора глutarового альдегида в течение 3–5 ч, контрастирование препаратов проводили парами 2,0–4,0 %-го водного раствора осмиевой кислоты (OsO₄) в течение 2–3 мин. При исследовании биопленок микобактерий выявляли этапы: седиментация; фиксация; коагрегация, рост микроколоний; формирование кластеров и архитектоники биопленки; дисперсия. Воздействие препарата «Йодлукман» в концентрации 2,5 %, при расходе рабочего раствора 250 мл/м² и экспозиции не менее 3 ч полностью обеззараживало поверхности тест-объектов, которые были экспериментально контаминированы микобактериями. Происходило

разрушение межклеточного матрикса, целостность клеток, находившихся под биопленкой, нарушалась, что сопровождалось увеличением светопреломления и снижением оптической плотности. Для обеззараживания поверхностей тест-объектов, контаминированных микобактериями, установлена эффективность дезинфицирующего препарата «Йодлукман», представляющего собой комплекс йода кристаллического и полимерного поверхностно-активного компонента.

Ключевые слова: адгезия, микобактерии, матрикс, биопленки, оптическая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия; препарат «Йодлукман».

The study presents the data on the research of morphological and densitometrical features of biofilms formation by mycobacteria before the exposure to the iodine-containing preparation "Jodlukman". The cultures of microorganisms *Mycobacterium B5* were used in the experiments cultivated on Levenstein-Jensen medium at 37 °C. Biofilm formation of mycobacteria was investigated before the exposure of the drug "Jodlukman". The cultures of microorganisms were brought in holes on 200 mkl and cultivated 24 h at 37 °C. There were 200 µl of microorganism cultures put in wells and they were cultured for 24 hours at 37 °C. After 20 minutes the wells were washed three times with buffer solution, dried and fixed for 30 minutes with 200 µl using 95 ° ethyl alcohol. To study the stages of biofilm formation the method of culturing bacteria in the beef-extract broth was used. To control the growth and development of bacteria the color of 1.0 % aqueous solution of methylene blue was used. Along with conventional method the fixation with 25.0 % solution of glutaraldehyde was used for 3–5 hours; the contrasting of the drugs was carried out in pairs of 2.0–4.0 % aqueous solution

of osmic acid (OsO_4) for 2–3 minutes. The study of biofilms mycobacteria revealed the following stages: sedimentation; fixation; coaggregation, the growth of microcolonies; formation of clusters and architectonics of biofilms; dispersion. The effect of the drug "Jodlukman" in 2.5 % concentration at consumption of working solution is 250ml / m^2 and at least 3 hours exposure completely disinfected the surface of test objects, experimentally contaminated with mycobacteria. There was destruction of intercellular matrix, the integrity of the cells under the biofilm was violated which was accompanied by the increase in light refraction and the decrease in optical density. For disinfecting of surfaces of test objects, contaminated with mycobacteria, the efficiency of the disinfecting preparation "Jodlukman" representing the complex of crystalline and polymeric surface-active component was established.

Keywords: adhesion, mycobacteria, matrix, biofilms, optical microscopy, scanning electron microscopy; the drug "Jodlukman".

Введение. В структуре инфекционной патологии значительную долю составляют хронически протекающие заболевания, в том числе широко распространенные во всем мире микобактериозы, социальную и экономическую значимость которых трудно переоценить [9]. Применение композиционных препаратов, в том числе йодсодержащих, позволяет уменьшить вредное и агрессивное воздействие активноразрушающего вещества (АРВ) на обрабатываемую поверхность за счет снижения концентрации йода в рабочих растворах препарата, как правило, обеспечивающего основной эффект обеззараживания [4, 5]. Для расширения ассортимента дезинфицирующих средств во избежание появления резистентных форм микроорганизмов необходима ротация применяемых бактериальных препаратов, поэтому приоритетным направлением научных изысканий является исследование взаимосвязи процессов формирования биопленок, гетерогенной структуры популяции бактерий при воздействии эффективных дезинфицирующих препаратов для снижения временных и экономических затрат.

Цель исследования: изучение структурно-функциональных особенностей формирования микобактериями биопленок до и после воздействия йодсодержащего препарата.

Материалы и методы исследования. 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 °С, 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 [4, 5].

Исследования устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим препаратам проводили в соответствии с методическими указаниями «О порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики» (М., 1987), «Проведение дезинфекции и дезинвазии

объектов государственного ветеринарного надзора» (М., 2002).

Оптическую плотность (D) жидкости определяли в фотометрическом анализаторе «Immunochem-2100 HTI» (США) при длине волны 490 нм. В лунки вносили по 200 мкл культур микроорганизмов, выращенных в мясопептонном бульоне с 1,0 % глюкозы и разведенных 1 : 100, и культивировали 24 ч при 37 °С. Из лунок удаляли жидкость, трижды промывали их фосфатно-солевым раствором (pH 7,2), подсушивали и 60 мин фиксировали при 60 °С. В каждую лунку вносили по 200 мкл 0,1 %-го раствора кристаллвиолета. Через 20 мин лунки трижды промывали буферным раствором, подсушивали и фиксировали в течение 30 мин 200 мкл 95° этилового спирта [10].

Для изучения этапов формирования биопленок применяли способ культивирования бактерий в МПБ. Для этого 5,0 мл взвеси 18-часовых культур микроорганизмов *Mycobacterium* B5 (концентрация 10^5 КОЕ/мл), шейкерывали на аппарате «Vortex» и вносили в чашки Петри с 20 мл МПБ, на дно которых помещали обезжиренные покровные стекла. Образцы культивировали при 37 °С и экспозиции 6, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120 ч. Для контроля роста и развития бактерий использовали окраску 1,0 % водным раствором метиленового синего; фиксацию парами 25,0 %-го (по ДВ) раствора глутарового альдегида в течение 3–5 ч, контрастирование препаратов проводили парами 2,0–4,0%-го водного раствора осмиевой кислоты (OsO_4) в течение 2–3 мин [4].

Для получения репрезентативной информации исследование проводили методом случайного отбора полей зрения оптического микроскопа «H604 Trinocular» (Unico, США), стереоскопического микроскопа «МС-1 Стерео» (Биомед, Россия), настольного сканирующего электронного микроскопа «ТМ 3030 plus» (Holland).

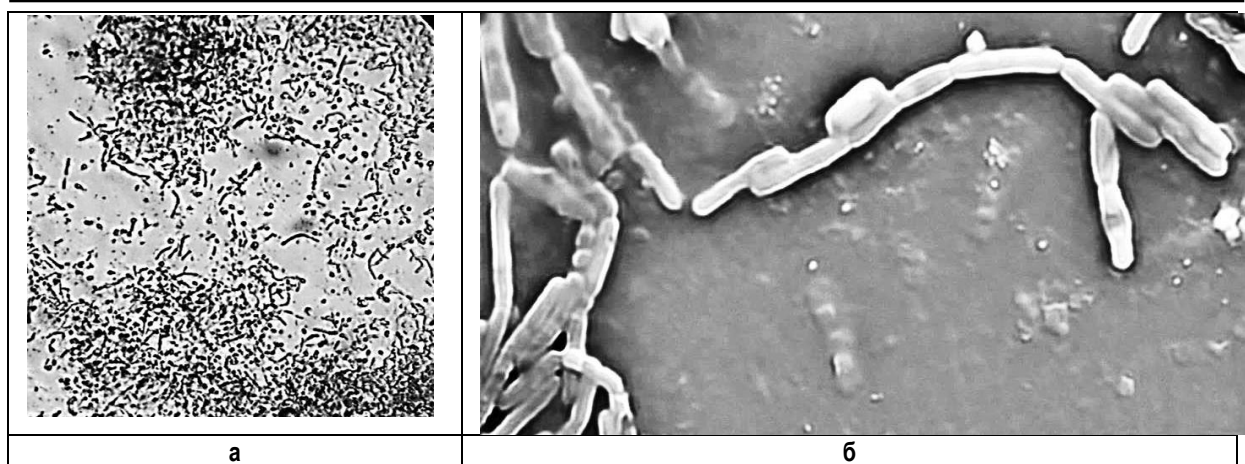
Данные экспериментов обрабатывали методом статистического анализа с использованием критерия достоверности Стьюдента, считая различия достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования. 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 (рис.).



Особенности формирования биопленок штамма *Mycobacterium B5*: а – оптическая микроскопия. Ок. 10, об. 40; б – сканирующая электронная микроскопия, $\times 7000$

Микроколонии постепенно становились крупными, выявлялись окрашенные плотные участки, разделенные матричными пустотами, в дальнейшем наблюдали формирование кластеров, вдоль которых проходили содержащие жидкость округлые каналы.

Через 72–96 ч культивирования микроорганизмов клетки, способные прикрепляться к поверхности, откреплялись от края микроколоний и образовывали новые колонии.

Во многих участках происходило разрушение межклеточного матрикса, целостность клеток, находившихся под биопленкой, нарушалась, что сопровождалось увеличением светопреломления и снижением оптической плотности.

Способ подготовки препаратов микробактерий в многослойной культуре микроорганизмов и окраска клеток параами осмиевой кислоты позволяет прижизненно изучать морфологию клеток в процессе формирования микроколоний, сохраняя естественную архитектуру биопленок.

Результаты бактериологических исследований показывают, что препарат «Йодлукман» в концентрации 2,5 %, при расходе рабочего раствора 250 мл/м² и экспозиции не менее 3 ч полностью обеззараживает поверхности тест-объектов (дерево, металл, бетон, кирпич), которые были экспериментально контаминированы микобактериями (табл.).

Изучение эффективности препарата «Йодлукман» при контаминации микобактериями тест-объектов

Тест-объект	Расход, мл/м ²	Концентрация препарата	Экспозиция, ч	Исследовано проб		I	II
				Всего	Обеззаражено		
Дерево	250	2,5	3	30	30	+	-
Металл	250	2,5	3	30	30	+	-
Бетон	250	2,5	3	30	30	+	-
Кирпич	250	2,5	3	30	30	+	-

Примечание: (-) – обеззаражено; (+) – не обеззаражено; I – контроль; II – опыт.

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 ($D = 0,699\text{--}1,510$) 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 [2, 4]. При формировании биопленок происходит адгезия микобактерий, синтез экзополисахаридного матрикса [7]. 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 – преобладающая форма существования микроорганизмов, перспективным направлением комплексной

терапии и профилактики инфекционной патологии является эрадикация биопленок [1]. Для предотвращения формирования биопленок перспективными признаны препараты, снижающие адгезию бактериальных клеток и содержащие биоциды, проникающие в матрикс [1, 7, 10].

Заключение. При изыскании антибактериальных препаратов следует учитывать, что составной частью жизненного цикла бактерий является формирование биопленок, образованных клетками и внеклеточным матриксом. Для обеззараживания поверхностей тест-объектов, контаминированных микобактериями, установлена эффективность дезинфицирующего препарата «Йодлукман», представляющего собой комплекс йода кристаллического и полимерного поверхностно-активного компонента.

Литература

1. Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 23–28.
2. Ленченко Е.М., Бинхун Ху, Ломова Ю.В. Исследование антагонистических свойств и чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // Аграрная наука. – 2017. – № 6. – С. 17–23.
3. Ленченко Е.М., Антонова А.Н. Исследование биопленок и фенотипических признаков бактерий // Ветеринария. – 2017. – № 5. – С. 31–35.
4. Павлова И.Б., Ленченко Е.М. Изучение морфологии популяции микобактерий методами оптической и электронной микроскопии // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2017. – № 4 (24). – С. 76–82.
5. Попов Н.И., Удавлиев Д.И., Шутеева Е.Н. Изучение эффективности препарата йодез в композиции с современными инсектоакарицидными препаратами для одновременной дезинфекции и деакаризации свиноводческих помещений // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2013. – № 1 (9). – С. 23–25.
6. Kulka K., Hatfull G., Ojha A.K. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms // Journal of visualized experiments. – 2012. – № 60. – P. 3807–3820.
7. Kumar T.S., Kumar V., ShoorVir S. et al. Chemical and Ultrastructural Characteristics of Mycobacterial Biofilms // Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2015. – Vol. 10. – p. 592–622.
8. Ojha A.K., William R., Jacobs J.R. et al. Genetic dissection of Mycobacterial Biofilms // Mycobacteria Protocols. – 2015. – V. 1285. – P. 215–226.
9. World Health Organization: Library Cataloguing-in-Publication Data Global tuberculosis report 2016. WHO I. ISBN 978 92 4 156539 4 (NLM classification: WF 300) Ending TB by 2030 www.who.int/tb/data.
10. Wolber J.M., Urbanek B.L., Meints L.M. et al. The trehalose-specific transporter LpqY-SugABC is required for antimicrobial and anti-biofilm activity of trehalose analogues in Mycobacterium smegmatis // Carbohydr Res. – 2017. – V. 450. – P. 60–65.

Литература

1. Golub A.V. Bakterial'nye bioplenki – novaja cel' terapii? // Klin. mikrobiol. i antimikrob. himioter. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 23–28.
2. Lenchenko E.M., Binhun Hu, Lomova Ju.V. Issledovanie antagonisticheskikh svojstv i chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam // Agrarnaja nauka. – 2017. – № 6. – С. 17–23.
3. Lenchenko E.M., Antonova A.N. Issledovanie bioplenok i fenotipicheskikh priznakov bakterij // Ve-terinarija. – 2017. – № 5. – С. 31–35.
4. Pavlova I.B., Lenchenko E.M. Izuchenie morfologii populjacji mikobakterij metodami opticheskoj i jelektronnoj mikroskopii // Problemy veterinarnoj sanitarii, gigijeny i jekologii. – 2017. – № 4 (24). – С. 76–82.
5. Popov N.I., Udavliev D.I., Shuteeva E.N. Izuchenie jeffektivnosti preparata jodez v kompozicii s so-vremennymi insektoakaricidnymi preparatami dlja odnovennojj dezinfekcii i dezakarizacii svinovodcheskikh pomeshhenij // Problemy veteri-narnoj sanitarii, gigijeny i jekologii. – 2013. – № 1 (9). – С. 23–25.
6. Kulka K., Hatfull G., Ojha A.K. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms // Journal of visualized experiments. – 2012. – № 60. – P. 3807–3820.
7. Kumar T.S., Kumar V., ShoorVir S. et al. Chemical and Ultrastructural Characteristics of Mycobacterial Biofilms // Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2015. – Vol. 10. – p. 592–622.
8. Ojha A.K., William R., Jacobs J.R. et al. Genetic dissection of Mycobacterial Biofilms // Mycobacteria Protocols. – 2015. – V. 1285. – P. 215–226.
9. World Health Organization: Library Cataloguing-in-Publication Data Global tuberculosis report 2016. WHO I. ISBN 978 92 4 156539 4 (NLM classification: WF 300) Ending TB by 2030 www.who.int/tb/data.
10. Wolber J.M., Urbanek B.L., Meints L.M. et al. The trehalose-specific transporter LpqY-SugABC is required for antimicrobial and anti-biofilm activity of trehalose analogues in Mycobacterium smegmatis // Carbohydr Res. – 2017. – V. 450. – P. 60–65.