

© ГОДОВАЛОВ А.П., КАРПУНИНА Т.И., 2019

Годовалов А. П., Карпунина Т. И.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА БИОПЛЕНОК ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614000, Пермь, Российская Федерация

*Существующие методы визуализации биопленки не предусматривают дифференцированной оценки её компонентного состава, поскольку отсутствует возможность установить субстрат, окрашиваемый генцианвиолетом, так как краситель может формировать комплексы, как с внутриклеточными, так и внеклеточными структурами. Такой подход не позволяет адекватно оценивать антибиоплёночные эффекты препаратов, в отличие от модификации существующего метода для определения соотношения клеточной части и матрикса биоплёнок грамположительных микроорганизмов. Оценку компонентного состава биоплёнок осуществляли с помощью двухэтапного подхода, когда сформированные биоплёнки грамположительных микроорганизмов окрашивали генцианвиолетом в течение 5 мин с последующей фиксацией красителя в бактериальных клетках раствором Люголя, затем растворяли окрашенные продукты 95% спиртом: компоненты матрикса – в течение 1 мин, совокупной биоплёнки – в течение 15 мин, после чего оценивали состав биоплёнок по формуле:  $M = (OP_{бв}/OP_{15}) \times 100$ ,  $Kб = 100 - M$ , где  $M$  – доля матрикса, %;  $Kб$  – доля клеточной составляющей, %;  $OP_{бв}$  – оптическая плотность проб, когда спирт для растворения окрашенного продукта выдерживают не более 1 мин;  $OP_{15}$  – оптическая плотность проб, когда спирт для растворения окрашенного продукта выдерживают 15 мин. Показано, что в составе биоплёнки, сформированной коллекционным штаммом, доля матрикса составляет 13,2%, на клеточный компонент приходится 86,8%. При культивировании того же штамма в присутствии антибиотика наблюдается увеличение матрикса биоплёнки, что вероятно обусловлено компенсаторным ответом микроорганизма на действие антибиотика. Предлагаемый подход к изучению биоплёнок позволяет оценить её компонентный состав. Получение таким способом дополнительной информации может обеспечить повышение эффективности антимикробной терапии при сокращении времени исследования.*

**Ключевые слова:** биопленкообразующая активность; генцианвиолет; раствор Люголя; *S. aureus*.

**Для цитирования:** Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 632-634. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-632-634>.

Godovalov A.P., Karpunina T.I.

### THE DETERMINATION OF BIOFILM COMPOSITION OF GRAM-POSITIVE BACTERIA

Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, Russian Ministry of Health, 614990, Perm, Russian Federation

*Current methods of biofilm imaging do not support a differentiated assessment of its composition, since it is not possible to establish a substrate stained with crystal violet, as this dye can form complexes with both intracellular and extracellular structures. This approach does not adequately assess the anti-biofilm effects of drugs, while the results of studying the interaction of drugs with biofilm components can ensure their most correct choice. The aim of investigation was to study the possibility of applying the original modification of the current method to determine the ratio of the cellular part and the matrix of biofilms of gram-positive microorganisms. The biofilm components were analyzed using a two-step approach, when prepared biofilms of gram-positive microorganisms were stained with crystal violet for 5 minutes, followed by fixing the dye in bacterial cells with iodine solution, and then the colored products were dissolved with 95% alcohol: matrix components for 1 minute, total biofilm for 15 minutes, after which the composition of biofilms was estimated by the formula:  $M = (OP_{бв}/OP_{15}) \times 100$ ,  $Kb = 100 - M$ , where  $M$  is the proportion of the matrix, %;  $Kb$  - the proportion of the cellular component, %;  $OP_{бв}$  - optical density of samples, when alcohol was allowed to dissolve the colored product for no more than 1 minute;  $OP_{15}$  - was the optical density of samples, when alcohol is allowed to dissolve the colored product for 15 minutes. It was shown that in the composition of the biofilm formed by the collection strain, the proportion of the matrix was 13.2%, and the cellular component accounted for 86.8%. When the same strain cultivated in the presence of an antibiotic, an increase in the biofilm matrix was observed, which is probably due to the compensatory response of the microorganism to the action of the antibiotic. The proposed approach to the study of biofilms makes it possible to evaluate its component composition. Obtaining additional information in this way can provide, inter alia, an increase in the effectiveness of antimicrobial therapy while reducing the study time.*

**Key words:** biofilm-forming activity; crystal violet; iodine solution; *S. aureus*.

**For citation:** Godovalov A.P., Karpunina T.I. The determination of biofilm composition of gram-positive bacteria. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (10): 632-634. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-632-634>

**For correspondence:** Godovalov A.P., Candidate of Medical Sciences, lead researcher of the Central scientific laboratory, Associate Professor of Microbiology and Virology Department, e-mail: [AGodovalov@gmail.com](mailto:AGodovalov@gmail.com)

#### Information about authors:

Godovalov A.P., [http:// orcid.org/0000-0002-5112-2003](http://orcid.org/0000-0002-5112-2003)

Karpunina T.I., [http:// orcid.org/0000-0003-2511-4656](http://orcid.org/0000-0003-2511-4656)

**Для корреспонденции:** Годовалов Анатолий Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ, доц. каф. микробиологии и вирусологии; e-mail: [AGodovalov@gmail.com](mailto:AGodovalov@gmail.com)

**Acknowledgment.** The reported study was funded by RFBR and Perm Region according to the research projects 17-44-590404 p\_a .

**Conflict of interest.** The authors declare absence of conflict of interests.

Received 12.08.2019  
Accepted 26.08.2019

**Введение.** В развитии более 80% инфекционно-воспалительных заболеваний человека прослеживается участие биоплёнок, образованных условно-патогенными микроорганизмами. Предполагается, что в основе хронизации воспалительного процесса лежит именно формирование биоплёнки, которая защищает микроорганизмы от факторов иммунной системы человека [1,2] и от антибактериальных препаратов [3]. По способности к биоплёнкообразованию микроорганизмы существенно различаются [4].

Для изучения биопленкообразующей активности микроорганизмов предложен широкий спектр методов, как в статических, так и в динамических условиях [5-7]. Наибольшее распространение получили исследования по культивированию биоплёнок в статических условиях в полистироловых плоскостных планшетах для ИФА. Широко используется методика, предложенная G.A.O'Toole [8]. Этот протокол интересен тем, что предусматривает изучение ранних стадий формирования биоплёнки, предполагает возможность изучения действия различных соединений и факторов на биоплёнку, проведение генетических исследований. В предложенной методике используется окраска биоплёнки генцианвиолетом. Генцианвиолет хорошо себя зарекомендовал при окраске бактерий по методу Грама [9,10], т. к. известно о его способности связываться с пептидогликаном клеточной стенки бактерий [11]. В методе Грама используется дополнительно йодный раствор Люголя для образования генцианвиолетом нерастворимых комплексных соединений [10, 11]. Нет однозначного мнения о том, какие вещества в биоплёнке окрашиваются этим красителем. Генцианвиолет способен окрашивать белково-полисахаридные комплексы, входящие в состав нуклеоида, клеточной стенки, межклеточного пространства [12,13], формируя «большие» комплексные молекулы. Биоплёнка фирмикотов представляет структуру, состоящую из клеточного компонента и соединений матрикса, среди которых значительную часть составляют полисахариды [14,15]. Используемый для её визуализации краситель должен соответствовать нескольким требованиям: он должен окрашивать клетки и матрикс биоплёнок; его цвет должен соответствовать длине волны фильтра, используемого в фотоэлектроколориметре при учёте результатов; остатки красителя в лунках должны легко удаляться промыванием, без повреждения биоплёнок [16]. При использовании генцианвиолета, который соответствует перечисленным требованиям, проблемы возникают с определением соотношения клеточной части и матрикса в общей совокупности массы плёнки, между тем этот показатель может быть существенным в клинической лабораторной диагностике.

Цель исследования – изучить возможность применения оригинальной модификации существующего метода для определения соотношения клеточной части и матрикса биоплёнок грамположительных микроорганизмов.

**Материал и методы.** Исследования проведены на штаммах *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis* из коллекции АТСС. Культивирование микроорганизмов осуществляли в 96-луночных полистироловых план-

шетах в питательном бульоне в течение 24-48 ч при 37° С. Сформировавшиеся плёнки изучали по стандартной [8] и модифицированной методике [17]: планктонную культуру из лунок планшета удаляли и промывали их забуференным физиологическим раствором. Далее в планшет вносили 0,1%-водный раствор генцианвиолета на 5 мин, затем раствор Люголя на 2 мин. По окончании окраски планшеты промывали и высушивали на воздухе, предохраняя их от попадания солнечных лучей.

На первом этапе часть лунок (не менее 5) заливали 95% спиртом и сразу же переносили элюат в новый планшет. На втором этапе другую часть лунок (не менее 5) так же заливали 70% спиртом и выдерживали 15 мин, после чего собирали элюат в новый планшет. Полученные образцы анализировали на спектрофотометре PowerWave X при длине волны 560 нм.

Для вычисления доли матрикса и клеточной составляющей в биоплёнке использовали формулы:

$$M = (OP_{об} / OP_{15}) \times 100,$$

$$Kб = 100 - M, \text{ где}$$

M – доля матрикса, %;

Kб – доля клеточной составляющей, %;

OP<sub>об</sub> – оптическая плотность проб, когда спирт для элюации выдерживали не более 1 мин.;

OP<sub>15</sub> – оптическая плотность проб, когда спирт для элюации выдерживали 15 мин [17].

Для подтверждения целесообразности дифференцированного подхода при анализе плёнокообразующей способности дополнительно проводили эксперименты с воздействием бактериостатических концентраций антибактериальных препаратов.

**Результаты.** При определении оптической плотности элюатов традиционным способом установлены показатели, типичные для биоплёнок, сформированных штаммами *S. aureus* 0,364±0,029 у.е. и *S. epidermidis* - 0,336±0,031 у.е. По модифицированной методике для штамма *S. aureus* АТСС 28922 характерны следующие показатели: OP<sub>об</sub>=0,310; OP<sub>15</sub>=2,356; M=13,2%; Kб=86,8%. В составе биоплёнки, сформированной коллекционным штаммом, доля матрикса составляла 13,2%, на клеточный компонент приходилось 86,8%. Можно предположить, что такое соотношение компонентов соответствует оптимальному для стафилококков уровню, что обусловлено адекватными условиями культивирования штамма [18].

В случае культивирования штамма *S. aureus* АТСС 28922 в присутствии цефазолина изучаемые показатели изменились: OP<sub>об</sub>=0,189; OP<sub>15</sub>=0,453; M=41,7%; Kб=58,3%, т.е. удельный вес матрикса увеличился, доля клеточного компонента снизилась. Полученный результат предположительно связан с действием антибиотика, который ингибирует синтез пептидогликана основного вещества клеточной стенки стафилококков. В результате этого число клеток в биоплёнке снижается. Оставшиеся жизнеспособными клетки стафилококка компенсаторно увеличивают продукцию веществ матрикса для защиты от антибиотика [4, 19]. При использовании цефазолина необходимо дополнять терапевтическую схему препаратами, действие кото-

рых направлено на разрушение матрикса.

**Обсуждение.** При изучении морфологии клеток с использованием метода Грама, окраска генцианвиолетом зависит от разного строения клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий, в частности, содержания пептидогликана, тейхоевых кислот, ионов магния и др. Неотъемлемой частью окраски грамположительных микроорганизмов является формирование сложных комплексных соединений между красителем и их специфическими компонентами при участии раствора Люголя, что обеспечивает прочное удержание красителя в толще пептидогликана. Это легло в основу предложенной модификации традиционного метода. При непродолжительной экспозиции 95% этиловый спирт способен сужать поры клеточной стенки. Это послужило основанием для применения двухэтапного подхода в реализации методики. На первом этапе краткосрочное (1 мин) воздействие спирта обеспечивает элюацию только компонентов окрашенного матрикса, а при 15-минутной экспозиции выход окрашенного продукта увеличивается за счёт разрушения клеток, определение оптической плотности такого элюата даёт информацию о совокупной массе биоплёнки.

**Заключение.** Предложен двухэтапный подход, позволяющий на первом этапе оценить долю матрикса в биоплёнке, на втором – совокупность клеточных и экстрацеллюлярных компонентов. Предлагаемая модификация позволяет дискриминировать компонентный состав биоплёнок грамположительных бактерий благодаря привлечению раствора Люголя и вариабельности сроков спиртовой экспозиции. Полученная таким способом дополнительная информация может обеспечить повышение эффективности антимикробной терапии за счёт комбинации лекарственных средств с различными мишенями действия при сокращении времени исследования.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта 17-44-590404 п\_а.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 7-13, 15 см. REFERENCES)

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка - «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*. 2007; 76 (2): 149-63.
2. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Гущин М.О. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища инфертильных женщин. *Медицинский академический журнал*. 2017; 17(4): 53-4.
3. Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журин М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты. *Микробиология*. 2017; 4: 402-20.
4. Цветкова А.В., Фахретдинова В.Р., Маркушева Т.В., Мавзытов А.Р. Биопленки: методика сравнительной оценки интенсивности роста бактерий. *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. 2017; 3-1: 209-13.
5. Симонова И.Р., Головин С.Н., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Титова С.В. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2017; 1: 75-81.
6. Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 4: 238-41.
14. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 12: 59-63.
16. Терещенко В.С. Способ выявления биопленкообразующей способности у грамотрицательных бактерий. *Известия Самарского*

го научного центра Российской академии наук. 2015; 17(5-3): 917-9.

17. Карпунина Т.И., Годовалов А.П., Рябова Л.Д. Способ оценки состава биопленок грамположительных бактерий. Патент РФ № 2688215; 2019.
18. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Биопленкообразование оппортунистических микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 52-4.
19. Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Носков С.М., Романов В.А. Формирование биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными у больных с ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(11): 53-5.

#### REFERENCES

1. Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Is biofilm a “city of microbes” or an analogue of a multicellular organism? *Mikrobiologiya*. 2007; 76 (2): 149-63. (in Russian)
2. Godovalov A.P., Karpunina T.I., Guschin M.O. Features of intermicrobial relations in the microbiota of the vagina infertile women. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2017; 17(4): 53-4. (in Russian)
3. Plakunov V.K., Martyanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Controlling the formation of microbial biofilms: anti- and probiofilm agents. *Mikrobiologiya*. 2017; 4: 402-20. (in Russian)
4. Tsvetkova A.V., Fakhretdinova V.R., Markusheva T.V., Mavzyutov A.R. Biofilms: a method of comparative assessment of the growth rate of bacteria. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2017; 3-1: 209-13. (in Russian)
5. Simonova I.R., Golovin S.N., Verkina L.M., Berезnyak E.A., Titova S.V. Methods of cultivation and study of bacterial biofilms. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennyye nauki*. 2017; 1: 75-81. (in Russian)
6. Titova S.V., Verkina L.M. Simulation of cholera vibrio biofilms on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and fluorescent microscopes. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 4: 238-41. (in Russian)
7. Hannig C., Follo M., Hellwig E., Al-Ahmad A. Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J. Med. Microbiol*. 2010; 59: 1-7.
8. O'Toole G.A. To build a biofilm. *J. Bacteriol*. 2003; 185(9): 2687-9.
9. Maley A.M., Arbisser J.L. Gentian violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. *Exp. Dermatol*. 2013; 22(12): 775-80.
10. Coico R. Gram staining. *Curr. Protoc. Microbiol*. 2005; Appendix 3: Appendix 3C.
11. Budin G., Chung H.J., Lee H., Weissleder R. A magnetic Gram stain for bacterial detection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2012; 51(31): 7752-5.
12. Wilhelm M.J., Sheffield J.B., Sharifian Gh.M., Wu Y., Spahr C., Gonnella G., Xu B., Dai H.L. Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *ACS. Chem. Biol*. 2015; 10(7): 1711-7.
13. Popescu A., Doyle R.J. The Gram stain after more than a century. *Biotech. Histochem*. 1996; 71(3): 145-51.
14. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsarev V.N. Features of the morphology of periodontal biofilm in inflammatory diseases of the gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, candida-associated periodontitis) according to electron microscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 12: 59-63. (in Russian)
15. You H., Zhuge P., Li D., Shao L., Shi H., Du H. Factors affecting bacterial biofilm expression in chronic rhinosinusitis and the influences on prognosis. *Am. J. Otolaryngol*. 2011; 32(6): 583-90.
16. Tereshchenko V.S. A method for detecting biofilm-forming ability in gram-negative bacteria. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2015; 17(5-3): 917-9. (in Russian)
17. Karpunina T.I., Godovalov A.P., Ryabova L.D. The method of assessing the composition of the biofilms of gram-positive bacteria. Патент РФ № 2688215; 2019. (in Russian)
18. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Biofilm formation of opportunistic microorganisms in the blood plasma, depending on the iron content. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(1): 52-4. (in Russian)
19. Malafeeva E.V., Gul'neva M.Yu., Noskov S.M., Romanov V.A. Formation of biofilms by conditionally pathogenic microorganisms isolated from patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(11): 53-5. (in Russian)

Поступила 12.08.19

Принята к печати 26.08.19