

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Степанов М. С., Годовалов А. П., Кобзаренко Е. Е., Фадеева М. В., Гирь Э. А.

## НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ БИОПЛЁНОК

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Россия

Микробные биоплёнки представляют разнородные, способные к движению и постоянно изменяющиеся сообщества микроорганизмов, нередко разных таксонов. Подходы к изучению и оценке действия антибиоплёночных препаратов, широко представленные сегодня, не позволяют адекватно оценить их эффекты, в то время как именно результаты изучения взаимодействия лекарственных препаратов с компонентами биоплёнки могут обеспечить как можно более правильный выбор стратегии терапии. Цель исследования – апробация нового способа морфологической оценки биоплёнки. Для формирования биоплёнок использован подход, когда предметное стекло располагали по отношению к чашке Петри под углом в 30°-45°, в пространство между чашкой Петри и предметным стеклом заливали взвесь тест-штаммов *S. epidermidis* в мясо-пептонном бульоне. Рядом с предметным стеклом укладывали стерильный ватный тампон, смоченный дистиллированной водой, для создания оптимальной влажности. Система помещалась в термостат на 24 часа. Сформированные плёнки исследовались под микроскопом при помощи видеоокуляра DCM 310 и программы Scope photo x86, 3.1.312., позволяющей провести полное морфометрическое исследование плёнки: выделить слои, каналы, полости, произвести замеры с последующим сохранением результатов на электронном носителе в формате файлов jpg. При микроскопии окрашенного препарата установлено, что биоплёнка имеет слоистое строение. В каждом изображении, полученном с помощью видеоокуляра, можно дифференцировать 4 слоя. От границы двух сред внутри: слой фрагментации, плотный слой, слой матричного вещества, слой персистеров. Через всю толщину биоплёнки наблюдаются каналы разного диаметра (от 10 до 24 мкм). Используемый подход позволяет визуализировать и оценить структуру микробной биоплёнки, измерить толщину слоёв и диаметры каналов. Способ может быть использован для изучения действия антимикробных препаратов на бактериальные плёнки.

Ключевые слова: микробные биоплёнки; структура; морфологические особенности; *S. Epidermidis*; метод.

Для цитирования: Степанов М. С., Годовалов А. П., Кобзаренко Е. Е., Фадеева М. В., Гирь Э. А. Новый подход к изучению морфологической структуры микробных биоплёнок. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 649-651. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-649-651>

Stepanov M. S., Godovalov A. P., Kobzarenko E. E., Fadeeva M. V., Gyr E. A.

A NEW APPROACH FOR THE STUDY OF THE MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF MICROBAL BIOFILMS

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Microbial biofilms are heterogeneous, moving and constantly changing communities of microorganisms, often of various taxons. Approaches to study and assessment anti-biofilm drugs widely available today do not adequately assess their effects, while the results of studying the interaction of drugs with components of the film composition can provide them the right choice. The aim of investigation was to test a new method of morphological evaluation of biofilms. To form biofilms, we used an approach when the slide was placed at an angle of 30°-45° relatively to the Petri dish, and a suspension of test strains *S. epidermidis* in peptone broth was poured into the space between the Petri dish and the slide. A sterile cotton swab moistened with distilled water was placed next to the glass slide to create optimal humidity. The system was placed in a thermostat for 24 hours. The formed films were examined under a microscope using the DCM 310 video eyepiece and the Scope photo x86,3.1.312 program that allowed to conduct a complete morphometric study of the film: select layers, channels, cavities and make measurements, and then save the results on electronic media in jpg file format. Microscopy of the stained slides revealed that the biofilm has a layered structure. In each image obtained using a video eyepiece, it was possible to differentiate 4 layers. From the border of the two media to the inside: the fragmentation layer, the dense layer, the matrix substance layer, and the last one – the persistence layer. Channels of different diameters (from 10 to 24 microns) are observed across the entire thickness of the biofilm. Thus, used approach allows us to visualize and evaluate the structure of microbial biofilm, measure the thickness of layers and channel diameters. In addition, this method can be used to study the effect of antimicrobial drugs on bacterial films.

Key words: microbial biofilms; structure; morphological features; *S. epidermidis*; method.

For citation: Stepanov M. S., Godovalov A. P., Kobzarenko E. E., Fadeeva M. V., Gyr E. A. A new approach for the study of the morphological structure of microbial biofilms. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (10): 649-651 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-649-651>

For correspondence: Godovalov A.P.; e-mail: [AGodovalov@gmail.com](mailto:AGodovalov@gmail.com)

### Information about authors:

Stepanov M.S., <http://orcid.org/0000-0002-3994-5461>;  
Godovalov A.P., <http://orcid.org/0000-0002-5112-2003>;  
Kobzarenko E.E., <http://orcid.org/0000-0001-6130-8402>;  
Fadeeva M.V., <http://orcid.org/0000-0003-0249-4772>;  
Gyr E.A., <http://orcid.org/0000-0003-3519-3394>.

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

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

Received 12.05.2020  
Accepted 15.05.2020

**Введение.** Микробные биоплёнки представляют разнородные, способные к движению и постоянно изменяющиеся сообщества микроорганизмов, нередко разных таксонов. Состав биоплёнки можно разделить на две части: клеточную и матрикс, способный защитить микроорганизмы от неблагоприятных факторов, действующих на биоплёнку, в том числе от эффекторов иммунитета и антимикробных средств [1, 2]. Проведено много исследований, раскрывающих роль различных компонентов биоплёнки и их функции. Исследован состав матрикса, биоплёнкообразование в условиях живого организма, действие факторов физической и химической природы на биоплёнку [3, 4]. Многие аспекты жизнедеятельности микробного сообщества в виде биоплёнки остаются нераскрытыми. Существующие методы визуализации биоплёнок не позволяют дифференцировать компоненты их состава, так как используемые красители способны формировать комплексы, как с внутриклеточными, так и с внеклеточными структурами. Ввиду этого, невозможно точно определить субстрат окрашивания. Подходы по изучению и оценке антибиоплёночных препаратов [5-7], широко представленные сегодня, не позволяют достаточно адекватно оценить их эффекты, в то время как именно результаты изучения взаимодействия лекарственных препаратов с компонентами плёночного состава могут обеспечивать их правильный выбор [8, 9].

Цель исследования – апробация нового способа морфологической оценки биоплёнки.

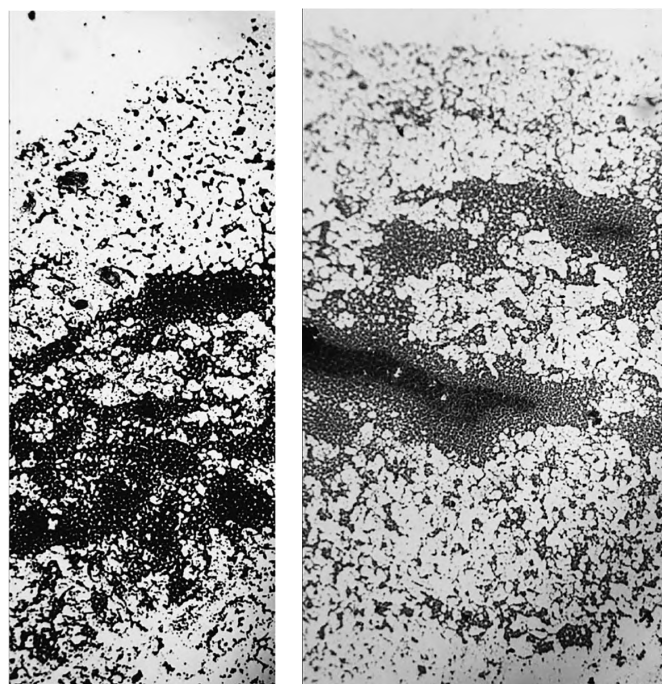
**Материал и методы.** Для формирования биоплёнок использован подход, когда предметное стекло располагали по отношению к чашке Петри под углом в 30°-45°, в пространство между чашкой Петри и предметным стеклом заливали взвесь тест-штаммов *S. epidermidis* ATCC 28922 в мясо-пептонном бульоне (МПБ). Создается разделение сред «жидкость-воздух», что приближается к идеальным условиям для формирования биоплёнки. Рядом с предметным стеклом укладывали стерильный ватный тампон, смоченный дистиллированной водой, для создания оптимальной влажности. Система помещалась в термостат на 24 часа. После 24-часовой инкубации стекло извлекали и промывали забуференным физиологическим раствором и после непродолжительного подсушивания фиксировали в пламени спиртовки с последующей окраской по методу Грама. Сформированные биоплёнки исследовались под микроскопом при помощи видеоокуляра DCM 310 и программы Score photo x86, 3.1.312., позволяющей провести полное морфометрическое исследование биоплёнки: выделить слои, каналы, полости, произвести замеры с последующим сохранением результатов на электронном носителе в формате файлов jpg [10].

**Результаты.** При микроскопии окрашенного препарата установлено, что биоплёнка имеет слоистое строение. В каждом изображении, полученном с помощью видеоокуляра, можно дифференцировать 4 слоя (см. рисунок, а). Они отличаются по размеру, густоте заселения микроорганизмами и содержанию матриксного вещества. Данные особенности морфологии слоёв по-

зволили обозначить их. От границы двух сред кнутри: слой фрагментации, плотный слой, слой матриксного вещества, слой персистеров. Через всю толщу биоплёнки наблюдаются каналы разного диаметра (от 10 до 24 мкм). Самый первый слой, наружный (193±20 мкм), образовавшийся на границе двух сред, имеет интенсивную окраску по Граму, содержит большое количество микроорганизмов, находящихся в состоянии покидания материнской биоплёнки. Этот слой объясняет стадию фрагментации в морфо- и патогенезе биоплёнкообразования, он содержит микрочастицы, готовые к отрыву и колонизации новых сайтов. Следующий слой – плотный, значительно больше первого (269±41 мкм;  $p < 0,05$  к размеру наружного слоя), здесь находится основная масса микроорганизмов, принимающих участие в метаболизме, построении и фрагментации биоплёнки. Эта зона является основным местом обитания микроорганизмов. Биоплёнка – открытая формация, взаимодействующая с окружающей средой [11]. Все продукты жизнедеятельности и токсины сбрасываются через пронизывающую биоплёнку систему каналов и цистерн, предназначенных для запасаения каких-либо полезных веществ и удаления продуктов обмена биоплёнок [12]. В ряде случаев система каналов и цистерн делит этот слой на равные части (см. рисунок, б). Предпоследним слоем является слой матриксного вещества (508±50 мкм;  $p < 0,05$  при сравнении с размерами предыдущих слоев), содержащий лишь единичные вкрапления микроорганизмов на большом протяжении. Предполагается, что данный слой ответственен за сохранение и существование бактерий-персистеров и является хранилищем питательных веществ. Последний слой составляют сами клетки-персистеры, имеющие слабую приверженность к окраске, представляющие резерв микробной популяции, реализующийся в неблагоприятных для биоплёнки условиях.

**Обсуждение.** Располагаясь в организме или на абиотических объектах, биоплёнка имеет трёхмерную структуру, которую ограничивают лишь резкие границы изменения факторов (например, разделение двух сред). Существует много методов визуализации биоплёнок, среди которых широко применяемым является способ G. O'Toole [13], использующий плоскодонный иммунологический планшет. В этом случае биоплёнка образуется в лунке планшета, и при визуализации её с помощью микроскопа будет представлять напластования слоёв без возможности дифференциации. Представленный в эксперименте способ позволяет увидеть биоплёнку на протяжении предметного стекла от начала накопления биомассы до границы воздуха. Метод не позволяет увидеть трёхмерную структуру пленки, но даёт яркую картину среза, проецированного на исследуемое стекло. Преимущество метода заключается в том, что он удобен для окрашивания любым способом, позволяющим выделить субстрат каждого слоя биоплёнки, сформированного тем или иным микроорганизмом, что в последующем поможет судить о биохимическом составе исследуемой формации.

**Заключение.** Использованный подход позволяет визуализировать и оценить структуру микробной био-



*a*

*б*

Морфологическая структура биопленки *Staphylococcus epidermidis*. *a* – слоистая структура, *б* – показан плотный слой, пронизанный системой каналов и цистерн. Окраска по Граму. Ув.  $\times 10$ .

плёнки, измерить толщину слоёв и диаметры каналов. Способ может быть применён для изучения действия антимикробных препаратов на бактериальные плёнки.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-7, 9, 12, 13 см. REFERENCES)

1. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Маянский Н.А. Матрикс микробных биопленок. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016; 18(1): 9-19.
2. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биоплёнки: структура, регуляция, отторжение. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 1:101-8.
3. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10): 632-4.

4. Петрова Н.В. Биоплёнки: этапы формирования, свойства и клинические последствия. *Клиническая патофизиология*. 2015; 3: 9-16.
8. Годовалов А.П., Степанов М.С., Яковлев М.В., Кобзаренко Е.Е., Батог К.А. Определение биоплёнкообразующей активности микроорганизмов на синтетических полимерных материалах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(12): 758-61.
10. Годовалов А.П., Степанов М.С., Кобзаренко Е.Е. Способ оценки морфологической структуры биоплёнок микроорганизмов. Патент РФ № RU 2719402 C1; 2020.
11. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г. Ультраструктура микробных биопленок при межклеточных взаимоотношениях бактерий в сообществах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 4:87-92.

#### REFERENCES

1. Chebotar' I.V., Mayanskiy A.N., Mayanskiy N.A. The matrix of microbial biofilms. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2016; 18(1): 9-19. (in Russian)
2. Mayanskiy A.N., Chebotar' I.V. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2011; 1:101-8. (in Russian)
3. Godovalov A.P., Karpunina T.I. Determination of the component composition of biofilms of gram-positive bacteria. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(10): 632-4. (in Russian)
4. Petrova N.V. Biofilms: stages of formation, properties and clinical consequences. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2015; 3: 9-16. (in Russian)
5. Kumar A., Alam A., Rani M., Ehtesham N.Z., Hasnain S.E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017; 307(8):481-9.
6. Stewart P.S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(3):10.
7. Yin W., Wang Y., Liu L., He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(14): 3423.
8. Godovalov A.P., Stepanov M.S., Yakovlev M.V., Kobzarenko E.E., Batog K.A. Determination of biofilm-forming activity of microorganisms on synthetic polymeric materials. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(12): 758-61. (in Russian)
9. Yan J., Bassler B.L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe*. 2019; 26(1):15-21.
10. Godovalov A.P., Stepanov M.S., Kobzarenko E.E. A method for evaluating the morphological structure of biofilms of microorganisms. Patent RF № RU 2719402 C1; 2020. (in Russian)
11. Rybal'chenko O.V., Bondarenko V.M., Orlova O.G. Ultrastructure of microbial biofilms in intercellular relationships of bacteria in communities. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2014; 4: 87-92.
12. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6(4):10.
13. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47: 2437.

Поступила 12.05.20

Принята к печати 15.05.20