

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Годвалов А. П., Степанов М. С., Яковлев М. В., Кобзаренко Е. Е., Батог К. А.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЛЁНКООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ НА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ

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

Микроорганизмы способны формировать биоплёнки на поверхностях биотической и абиотической природы. В биотопах человека имеются оптимальные условия для реализации биоплёнкообразующей активности. В медицинской практике часто используются полимерные материалы для дренирования или протезирования, которые могут быть успешно колонизированы бактериями. В лабораторной практике формирование биоплёнок, как правило, оценивают на стекле или полистироле. Цель исследования – оценить методические особенности изучения биоплёнкообразующей активности микроорганизмов на поверхности синтетических полимерных материалов. Использованы штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* K-12, *Candida albicans* ATCC 10231, синтетические полимерные материалы – композиционный материал светового отверждения ДентЛайт-флоу (наногибридный текучий композит; Россия), стеклоиономерный цемент химического отверждения Fuji 1 (Япония), цемент для временной фиксации ортопедических конструкций TempBond NE (США), акрил, полиуретан, поливинилхлорид. Формирование биоплёнок в плоскостных планшетах для ИФА в данном исследовании считали как контроль. В случае если полимер относился к материалам холодного отверждения, использовали стерильные плоскостные планшеты, на дно которых тонким слоем заливали пластмассу. После затверждения пластмассы, в планшетах формировали биоплёнки. Во второй серии экспериментов материалы горячего отверждения, нарезанные в виде одинаковых частей размером 5×5×1 мм, помещали в лунки планшета и вновь использовали для определения биоплёнкообразования с последующей окраской. Для экстракции красителя кусочки переносили в новый планшет, чтобы исключить объём биомассы плёнки, сформировавшийся на стенках лунок планшета. Культивирование в обоих случаях осуществляли при 37° С в течение 24-48 ч. Биомассу плёнки окрашивали фуксином. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину  $p < 0,05$ . Предлагаемые варианты определения биоплёнкообразующей способности являются доступными и показательными. Выявлено, что одни и те же микроорганизмы имеют индивидуальные показатели биоплёнкообразования для каждого полимерного материала. Стоматологический композит светового отверждения и поливинилхлорид проявляют наиболее выраженные антиадгезивные свойства, нежели цементы и полиуретан. До настоящего времени большая часть исследований биоплёнкообразования осуществлена с использованием стекла или полистирола, которые, как правило, не применяются для изготовления протезов, катетеров, дренажей и т. п., что затрудняет оценку истинной плёнкообразующей активности микроорганизмов. Предлагаемые методические подходы, особенно второй вариант подготовки образцов для тестирования, решают эту задачу. Предложенные подходы к тестированию биоплёнкообразующей активности на полимерах весьма просты в исполнении и общедоступны. Для адекватного исследования формирования биоплёнок будет целесообразным применение полимерных материалов непосредственно используемых в медицине, а не полистироловых планшет, материал которых встречается исключительно в лабораторной практике.

**Ключевые слова:** биоплёнкообразующая активность; биомасса плёнки; полимерные материалы; условно патогенные микроорганизмы.

**Для цитирования:** Годвалов 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): 758-761. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-758-761>

Godvalov 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

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Russian Federation

Microorganisms are able to form biofilms on surfaces of biotic and abiotic nature. In turn, in human biotopes there are optimal conditions for the implementation of biofilm-forming activity. Moreover, in medical practice, polymeric materials are often used for drainage or prosthetics, which can also be successfully colonized by bacteria. However, in laboratory practice, the formation of biofilms is usually evaluated on glass or polystyrene. The purpose of the study is to evaluate the methodological features of studying the biofilm-forming activity of microorganisms on the surface of synthetic polymeric materials. We used strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* K-12, *Candida albicans* ATCC 10231, as well as synthetic polymeric materials — DentLight Flow light-curing composite material (nano-hybrid fluid composite; Russia), glass ionomer chemical curing Fuji 1 (Japan), cement for temporary fixation of orthopedic constructions TempBond NE (USA), acrylic, polyurethane and polyvinyl chloride. The formation of biofilms in flat-bottomed ELISA plates in this study was considered as a control group. If the polymer belonged to cold curing materials, sterile flat-bottomed tablets were used, the bottom of which was filled with a thin layer of plastic. After hardening

of the plastic, biofilms were formed in the tablets. In the second series of experiments, hot cured materials cut into equal parts  $5 \times 5 \times 1$  mm in size were placed in the wells of a plate and again used to determine biofilm formation with subsequent coloring. To extract the dye, the pieces were transferred to a new plate to exclude the amount of film biomass formed on the walls of the plate wells. In both cases, cultivation was carried out at  $37^\circ\text{C}$  for 24-48 hours. The biomass of the film was stained with fuchsin. Statistical data processing was performed using *t*-Student criterion. For the threshold level of significance, the value  $p < 0.05$  was taken. It is established that the proposed options for determining biofilm forming ability are available and indicative. It was revealed that the same microorganisms have individual biofilm formation indicators for each polymer material. The light curing dental composite and polyvinyl chloride exhibit the more pronounced antiadhesive properties than cements and polyurethane. Up to date, most of the studies of biofilm formation have been carried out using glass or polystyrene, which, as a rule, are not used for the manufacture of prostheses, catheters, drains, etc., which makes it difficult to assess the true film-forming activity of microorganisms. The proposed methodological approaches, especially the second option for preparing testing samples, solve this problem. In general, the proposed approaches to testing biofilm-forming activity on polymers are very simple to implement and generally available. For an adequate study of the biofilms formation, it will be advisable to use polymer materials, directly used in medicine, rather than polystyrene tablets, the material of which is found exclusively in laboratory practice.

**Key words:** *biofilm-forming activity; biomass of the film; polymeric materials; conditionally pathogenic microorganisms.*

**For citation:** 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 (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (12): 758-761. (in Russ.)*

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-758-761>

**For correspondence:** Stepanov M.S.; e-mail: [maximpractice@gmail.com](mailto:maximpractice@gmail.com)

**Information about authors:**

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

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

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

Received 17.09.2019

Accepted 21.09.2019

**Введение.** Предметом классической микробиологии до конца XX века являлось исследование чистых культур микроорганизмов. В конце XX века описана и начала активно изучаться особая форма существования микроорганизмов – биоплёнка. Биоплёнка позволяет бактериям выдерживать неблагоприятные условия, которые создаются при действии факторов физической, химической, биологической природы. Это обусловлено наличием слизисто-полимерного слоя, состоящего из протеогликанов, липополисахаридов, гликопротеидов, гликокаликса и капсул бактерий, вырабатывающихся сразу после адгезии к поверхности.

Не вызывает сомнений роль микробных биоплёнок в этиологии заболеваний, связанных с катетеризацией сосудов, протезированием сердечных клапанов и суставов, вызванных грамположительными кокками; инфекций полости рта [1], мочевых путей и среднего уха. Данные заболевания с трудом поддаются лечению и имеют высокую частоту рецидивов. В патогенезе таких процессов ведущая роль отводится комплексу факторов: межвидовой обмен плазмидами резистентности, снижение чувствительности бактерий к факторам иммунитета, формирование микробных эмболов, возможность биоплёнок, представленных грамотрицательными микроорганизмами, индуцировать инфекционно-токсический шок.

Кроме тканей организма человека, биоплёнки колонизируют различные медицинские устройства небиологической природы, внедряемые в организм человека [2]. Микробные сообщества могут колонизировать любую поверхность в природных, клинических, промышленных условиях. Главным условием является текучесть на границе двух средовых фаз. Адгезивные свойства биоплёнок зависят от каче-

ственного состава самой биоплёнки, поверхности, на которой происходит рост, факторов, окружающей биоплёнку среды [3,4]. Интерес представляют стоматологические пломбирочные и протезные материалы, представленные в большом разнообразии, как по химическому составу, так и по свойствам. Взаимодействие таких материалов с микрофлорой полости рта изучено относительно мало. Ротовая полость является уникальным местом для образования биоплёнок, так как постоянная выработка слюны, содержащей большое количество веществ матриксоподобной природы, обуславливает текучесть на границе двух сред. Бактерии прикрепляются к поверхности в водном окружении и начинают выделять слизистое, клейкое вещество, которое может прикреплять их к ряду материалов, таких как металлы, пластмасса, композитные материалы, большинство стоматологических цементов.

При стационарном лечении пациентов часто используют катетеры и дренажи из поливинилхлорида и полиуретана, на которых микроорганизмы успешно могут формировать биоплёнку, однако этот феномен детально не изучен.

Предложено несколько методов для изучения биоплёнокообразующей активности микроорганизмов, как в статических, так и в динамических условиях. При использовании статических условий основным синтетическим материалом, на котором производят изучение роста, жизнедеятельности и поведения биоплёнок, является полистирол. Из данного материала изготавливают планшеты для иммунологических исследований, плоскодонная форма лунок которых является удобной платформой для изучения плёнокообразования. Адгезия микроорганизмов к полистиролу

не отражает истинной активности последних [5], особенно если учитывать тот факт, что протезные материалы, дренажи, катетеры не содержат в своем составе этот полимер. Полистироловые планшеты могут быть модифицированы для увеличения их адгезивных свойств, что требуется для иммунологических исследований. В связи с этим представляется интересным изучить биоплёнкообразование условно патогенными микроорганизмами непосредственно на материалах, использующихся в медицинской практике, и которые могут быть потенциально колонизированы микроорганизмами.

Цель исследования – оценить методические особенности изучения биоплёнкообразующей активности микроорганизмов на поверхности синтетических полимерных материалов.

**Материал и методы.** В работе использованы штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* K-12, *Candida albicans* ATCC 10231, синтетические полимерные материалы – композиционный материал светового отверждения ДентЛайт-флоу (наногибридный текучий композит; Россия), стеклоиномерный цемент химического отверждения Fuji I (Япония), цемент для временной фиксации ортопедических конструкций TempBond NE (США), акрил, полиуретан, поливинилхлорид. Формирование биоплёнок в плоскодонных планшетах для ИФА в данном исследовании считали контролем для сравнения с другими полимерными материалами, поскольку основная масса исследований проведена именно с использованием таких планшетов.

Для определения биоплёнкообразующей активности микроорганизмов проведены две серии экспериментов. Если полимер относился к материалам холодного отверждения, использованы стерильные плоскодонные планшеты, на дно которых тонким слоем заливали пластмассу. После затвердевания пластмассы, в планшетах формировали биоплёнки, которые окрашивали по методике описанной ниже. После экстракции красителя раствор переносили в новый планшет для фотометрирования. Во второй

серии экспериментов материалы горячего отверждения, нарезанные в виде одинаковых частей размером 5×5×1 мм, помещали в лунки планшета и вновь использовали для определения биоплёнкообразования с последующей окраской. Для экстракции красителя кусочки переносили в новый планшет, чтобы исключить объём биомассы плёнки, сформировавшийся на стенках лунок планшета.

Культивирование в обоих случаях осуществляли при 37°С в течение 24–48 ч. Для выявления биоплёнок использована методика [6] с некоторыми изменениями [7]. Вместо генцианвиолета использован фуксин, так как фуксин лучше фиксируется к полисахарам, которые являются одними из основных структурных компонентов биоплёночного матрикса.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Установлено, что предлагаемые варианты определения биоплёнкообразующей способности являются доступными и показательными. Выявлено, что одни и те же микроорганизмы имеют индивидуальные показатели биоплёнкообразования для каждого полимерного материала (табл. 1 и 2).

Наименее выражена биоплёнкообразующая активность условно патогенных микроорганизмов на композите светового отверждения (табл. 1), что может быть связано с меньшим поверхностным напряжением данного материала по сравнению с цементами. На поверхности такого материала имеется меньшее количество неровностей, так называемых ретенционных пунктов, способствующих прикреплению микроорганизмов. Наибольшая биомасса плёнки тест-штаммов установлена для цемента для временной фиксации ортопедических конструкций. Для стеклоиномерного цемента характерно образование биоплёнки преимущественно штаммами *E. coli* и *C. albicans* (табл. 1).

Показано, что *S. aureus* и *E. coli* практически не формируют биоплёнки на поливинилхлориде. Биомасса плёнки, образованной *C. albicans* на этом же материале практически не отличалась от таковой на полистироле.

Таблица 1

Биопленкообразующая активность тест-штаммов на разных стоматологических материалах

Материалы	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Стеклоиномерный цемент Fuji I (Япония)	1,14±0,001	1,13±0,001*	1,12±0,001*
Композит светового отверждения ДентЛайт флоу (Россия)	1,12±0,001	1,11±0,001	1,08±0,001
Цемент для временной фиксации ортопедических конструкций TempBond NE (США)	1,17±0,014*	1,23±0,042*	1,12±0,006*
Контроль (полистирол)	1,12±0,013	1,11±0,002	1,09±0,005

Примечание. \* -  $p < 0,05$  по отношению к контрольным пробам (полистирол).

Таблица 2

Биопленкообразующая активность условно патогенных микроорганизмов на полимерных материалах катетеров и дренажей

Материалы	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Поливинилхлорид	0,79±0,010*	0,99±0,018*	1,00±0,029
Полиуретан	1,28±0,021*	1,32±0,010*	1,38±0,020*
Контроль (полистирол)	1,12±0,013	1,11±0,002	1,09±0,005

Примечание. \* -  $p < 0,05$  по отношению к контрольным пробам (полистирол).

Все три вида микроорганизмов формируют значительную биоплёнку на полиуретане (табл. 2).

При использовании первого варианта подготовки планшет выявлен существенный недостаток, который заключается в невозможности полировки материала, залитого на дно лунки. При подготовке образцов материала для второго способа требуется строго соблюдать размеры проб, что в противном случае может исказить результаты тестирования. Тем не менее предложенные варианты просты в исполнении и не требуют дополнительных затрат и дорогостоящего оборудования, позволяют проводить исследования на разных полимерных материалах.

**Обсуждение.** Микроорганизмы обладают уникальными свойствами, среди которых возможность колонизации любых поверхностей как биотической, так и абиотической природы. Следующим за адгезией этапом является формирование биоплёнки, которая представляет серьёзную угрозу для здоровья человека, поскольку способна обеспечивать микроорганизмам устойчивость к действию повреждающих факторов, обмен генетической информацией и селекцию вирулентных штаммов. Фактор адгезии микроорганизмов к абиотическим поверхностям преимущественно связан с её структурой и зависит от критического напряжения поверхности [8]. Чем больше поверхностное напряжение синтетического материала (50-60 нм/м), тем выше вероятность адгезии на нем микроорганизмов. Материалы на полимерной основе имеют поверхностное напряжение не более 30 Нм/м. Поверхностное напряжение материала зависит от его обработки. Установлены очень низкие показатели роста бактерий *in vitro* на поверхности сплавов, отполированных до зеркального блеска.

Предлагаемые в настоящем исследовании методические подходы позволяют оценить биоплёнкуобразующую активность непосредственно на материалах, внедряемых в организм человека. До настоящего времени большая часть исследований биоплёнкуобразования осуществлена с использованием стекла или полистирола, которые не применяются для изготовления протезов, катетров, дренажей и т.п., что затрудняет оценку истинной плёнкуобразующей активности микроорганизмов. Предлагаемые методические подходы, особенно второй вариант подготовки образцов для тестирования, решают эту задачу. Тестирование биоплёнкуобразующей активности условно патогенной микрофлоры на полимерных материалах непосредственно перед их использованием позволит более эффективно проводить профилактику биоплёночной инфекции.

**Заключение.** Степень биоплёнкуобразования микроорганизмами на поверхности полимерных материалов зависит от состава данного материала. Стоматологический композит светового отверждения и поливинилхлорид проявляют наиболее выраженные антиадгезивные свойства, нежели цементы и полиуретан.

Предложенные подходы к тестированию биоплёнкуобразующей активности на полимерах весьма просты в исполнении и общедоступны. Для адекватного исследования формирования биоплёнок будет целе-

сообразным применение полимерных материалов непосредственно используемых в медицине, а не полистироловых планшет, материал которых встречается исключительно в лабораторной практике.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п. 6 см. REFERENCES)

1. Хавкин А.И., Ипполитов Ю.А., Алёшина Е.О., Комарова О.Н. Микробиота и болезни полости рта. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 6(118): 78-81.
2. Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(5): 308-13.
3. Царёв В.Н., Абакаров С.И., Умарова С.Э. Динамика колонизации микробной флорой полости рта различных материалов, используемых для зубного протезирования. *Стоматология*. 2000; 1: 55-7.
4. Царёв В.Н., Степанов А.Г., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С., Царёва Т.В. Контроль первичной адгезии микроорганизмов и формирования биоплёнок на стоматологических материалах, используемых для трансдентальной имплантации при зубосохраняющих операциях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(9): 568-73.
5. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Гушчин М.О. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища инфертильных женщин. *Медицинский академический журнал*. 2017; 17(4): 53-4.
7. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. О способности к биопленкообразованию *Candida albicans*, колонизирующих вагинальный биотоп. *Успехи медицинской микологии*. 2017; 17(17): 136-40.
8. Allais G. Биопленка полости рта. *Новое в стоматологии*. 2005; (4): 4-14.

#### REFERENCES

1. Khavkin A.I., Ippolitov Yu.A., Aleshina E.O., Komarova O.N. Microbiota and diseases of an oral cavity. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2015; 6(118): 78-81. (in Russian)
2. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Use of the scanning submicroscopy for the purpose of studying of biofilms of *Candida albicans* on the surface of basic plastic of removable orthopedic designs. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(5): 308-13. (in Russian)
3. Tsaryov V.N., Abakarov S.I., Umarova S.Ye. Dynamics of colonization by microbic flora of oral cavity of various materials used for a denture. *Stomatologiya*. 2000; 1: 55-7. (in Russian)
4. Tsaryov V.N., Stepanov A.G., Ippolitov E.V., Podporin M.S., Tsaryova T.V. Control of primary adhesion of microorganisms and forming of biofilms on the dental materials used for transdental implantation at the toothpreserving operations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(9): 568-73. (in Russian)
5. Godovalov A.P., Karpunina T.I., Gushchin M.O. Features of intermicrobial relations in the microbiota of the vagina infertile women. *Meditinskiy akademicheskij zhurnal*. 2017; 17(4): 53-4. (in Russian)
6. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47: 2437.
7. Godovalov A.P., Karpunina T.I. About the ability to biofilm formation of *Candida albicans* colonizing a vaginal biotope. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2017; 17(17): 136-40. (in Russian)
8. Allais G. Biofilm of oral cavity. *Novoe v stomatologii*. 2005; (4): 4-14. (in Russian)

Поступила 17.09.19

Принята к печати 21.09.19