

УДК 543.421

Студ. Т. Г. Пстыга

Науч. рук. доц. Н. А. Беясова

(кафедра биотехнологии и биоэкологии, БГТУ)

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБРАЗУЮЩИХ БИОПЛЕНКИ

В настоящее время в Беларуси разрабатываются антимикробные препараты, действие которых направлено на микроорганизмы, входящие в состав биопленок. Поэтому возникла задача выделить и охарактеризовать микроорганизмы, которые образуют биопленки, а также подобрать материал, на котором биопленки хорошо закрепляются.

Пленкообразующие микроорганизмы выделяли с поверхности корневых волосков клубней овощных культур, а также из проб почвы и воды.

Корешки срезали с клубней свеклы, моркови, корешков капусты, хорошо промывали, подсушивали и размещали на поверхности полужидкого казеинового агара в чашках Петри. Колонии пленочного типа отбирали и расчищали на плотной среде. Для пленкообразующих микроорганизмов характерен дендритный рост, представляющий собой ветвящиеся структуры, которые наиболее эффективно формируются на полужидкой среде [1].

Выделение пленкообразующих микроорганизмов из проб почвы и воды проводили методом биообрастания стекол, которые погружали в образцы почвы и воды, для закрепления на них микроорганизмов. Затем стекла промывали и размещали на поверхности полужидкого питательного агара. Фрагменты дендритных структур, наиболее удаленные от стекол, отбирали и расчищали.

В ходе проведенной работы было выделено 60 штаммов микроорганизмов, способных к дендритному росту. Чтобы сузить круг изолятов и выделить наиболее эффективные пленкообразователи, изучали диаметр дендритных структур, формирующихся вокруг посевов микроорганизмов уколом в полужидкий питательный агар. Основывались на данных [1] о существовании прямой зависимости между эффективностью формирования дендритных структур и способностью образования биопленок. На рисунке 1 приведено фото одной из чашек Петри с дендритными структурами, образовавшимися в местах посева изолятов методом «укола».

Семь штаммов бактерий показали лучшую пленкообразующую способность, их мы использовали в дальнейших исследованиях.

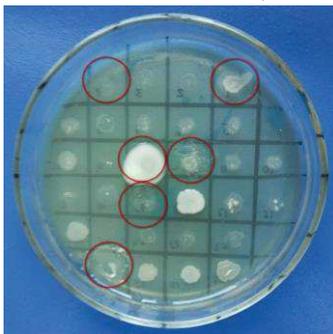


Рисунок 1 – Рост дендритных структур на полужидкой среде

Выделенные штаммы охарактеризованы на следующем этапе по способности формировать биопленки на разных носителях, с помощью количественного метода. В его основу положен следующий принцип: чем больше клеток в составе биопленки, тем больше красителя связывается с белком клеток, и тем выше интенсивность окраски, экстрагированного уксусной кислотой красителя генцианового фиолетового. Результаты исследования представлены на рисунке 2.

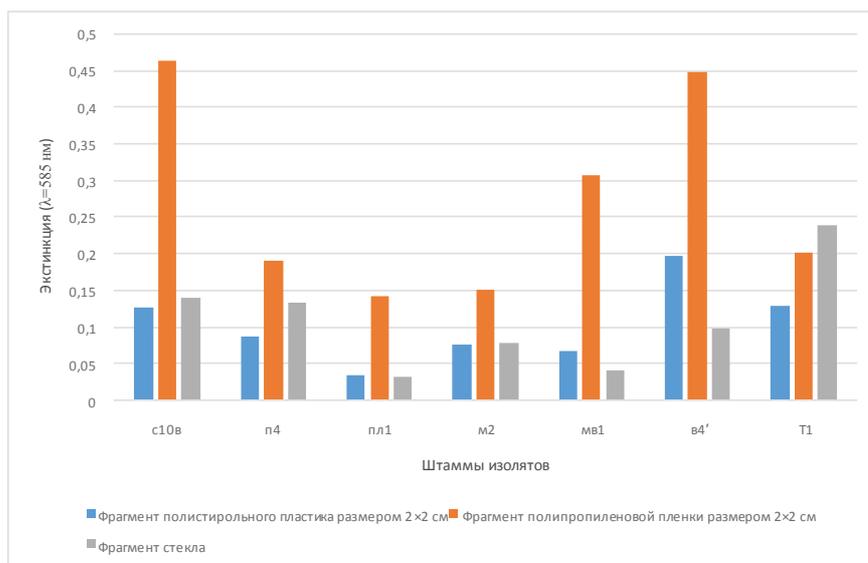


Рисунок 2 – Эффективность связывания генцианового фиолетового с клетками семи изолятов на разных носителях

Можно видеть, что лучшим носителем, на поверхности которого закрепляются изоляты, являются фрагменты полипропиленовой пленки, а наиболее активными пленкообразователями являются представители штаммов с10в, в4' и Т1.

Следующим этапом мы исследовали способность трех наиболее активных штаммов формировать биопленки на фрагментах полистирола и полипропилена размером 2×2 см, а также на объёмных гранулах полипропилена и полиэтилена.

В полусинтетическую среду помещали материал и культуру микроорганизмов. После культивирования биопленки, адсорбированные на поверхности материала, окрашивали красителем ГФ, который образует устойчивые комплексы с белком клеток микроорганизмов. Материал хорошо промывали от несвязанного красителя. Связанный с белком краситель экстрагировали уксусной кислотой. Оценивали концентрацию полученных биопленок по значениям экстинкции растворов [2]. В таблице приведены данные об экстинкции для трех выделенных штаммов.

Таблица – Результаты определения экстинкции красителя генцианового фиолетового, экстрагированного из биопленок

Носитель	Экстинкция красителя, экстрагированного из биопленок			
	c10в	в4'	T1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538
Гранулы полипропилена	0,081	0,086	0,483	0,014
Гранулы полиэтилена	0,050	0,038	0,405	0,055
Фрагмент полистирольного пластика размером 2×2 см	0,107	0,049	0,078	0,034
Фрагмент полипропиленовой пленки размером 2×2 см	1,448	0,187	0,251	0,019

Из приведенных в таблице данных следует, что отобранные штаммы обладают лучшей пленкообразующей способностью в сравнении с коллекционным штаммом *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6538, который по литературным данным проявляет способность к образованию биопленок. Из исследованных носителей наилучшими проявили себя гранулы и фрагменты полипропилена. Наиболее удобными в использовании являются гранулы полипропилена, поскольку обеспечивают получение навесок и позволяют эффективнее экстрагировать краситель. Первичная идентификация изолятов показала, что все они представлены бактериями. Клетки штамма T1 – аэробные, а c10в и в4' – факультативно анаэробные. Все изоляты – имеют клеточную стенку грамположительного типа и способны к образованию эндоспор.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fall, R. A simple method to isolate biofilm-forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots/ R. Fall, R.F. Kinsinger, K.A. Wheeler// Syst Appl Microbiol – 2004. – No 27(3). – S. 372–379.
2. Peeters, E. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates/ E. Peeters, H.J. Nelis, T. Coenye// Journal of Microbiological Methods. – 2008. – No 72. – S. 157–165.