

УДК 577.12:579.66

Студ. Н. В. Монида

Науч. рук. доц. Н. А. Белясова

(кафедра биотехнологии и биоэкологии, БГТУ)

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ В СОСТАВЕ БИОПЛЕНОК

В настоящее время известно, что подавляющее большинство бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно суспензированных клеток, а в виде прикрепленных к субстрату скоплений – биопленок [1]. Развитие биопленочных сообществ – одна из основных стратегий выживания микроорганизмов в окружающей среде, в организме человека и животных. Отрицательный эффект биопленок связан с их формированием на поверхности различных промышленных объектов, коммуникаций, медицинском и производственном оборудовании, а также с причиной развития хронических инфекционных заболеваний [2]. В результате имеют место значительные экономические потери, нарушение технологических процессов. Одной из главных проблем, таким образом, является разработка препаратов, обладающих антимикробной активностью по отношению к микроорганизмам в составе биопленок, поскольку в биопленках клетки приобретают качественно новые свойства по сравнению с суспензированными клетками: в первую очередь, способность защищаться от стрессовых воздействий, включая устойчивость к антибиотикам, дезинфектантам и др. [1, 2].

Целью исследования является разработка метода оценки эффективности воздействия новых антимикробных препаратов на клетки бактерий в составе биопленок. Микробиологические методы характеризуются значительной погрешностью, связанной с невозможностью получить однородную суспензию микроорганизмов, поэтому необходимо применять биохимические методы, позволяющие количественно оценить число жизнеспособных клеток.

Наиболее часто используемой и легче всего детектируемой является окислительно-восстановительная способность клеток. На первом этапе попытались модифицировать метод анализа молока на бактериальную обсемененность, основанного на редуктазной пробе. Метод основан на изменении окраски раствора метиленового синего (МС) под воздействием выделяемых клетками редуктаз [3]. Необходимо было установить, существует ли связь между количеством восстановленного МС и концентрацией бактериальной суспензии. Удобнее всего на данном этапе использовать планктонные культуры благодаря возможности подсчета клеток суспензионным методом. В эксперименте по

обесцвечиванию МС культуральными жидкостями с разной концентрацией жизнеспособных клеток установлено, что восстановление красителя происходит только в присутствии большого числа клеток, но при встряхивании суспензии, в которой произошло обесцвечивание метиленового синего, мгновенно восстанавливается синяя окраска, что, вероятно, обусловлено окислением его восстановленной формы кислородом воздуха. Отмеченные обстоятельства делают данный подход неприемлемым для регистрации редуктазной активности клеток.

Из литературных данных известно, что хорошие результаты по оценке окислительно-восстановительной активности клеток можно получить, основываясь на способности клеток восстанавливать неокрашенные соли тетразолия в ярко красный формазан [4]. На следующем этапе вместо метиленового синего в экспериментах по определению взаимосвязи между числом жизнеспособных клеток и их редуктазной активностью использовали биохимическую реакцию, основанную на восстановлении редокс индикатора ТТХ (2,3,5-трифенил-2Н-тетразолия хлорид) до окрашенного формазана. Чтобы разработать метод необходимо было установить, существует ли связь между количеством образованного формазана и метаболической активностью жизнеспособных клеток в суспензиях с разной их концентрацией. Для этого использовали серию десятикратных разведений суточной культуры *Enterococcus faecalis* M42.1.3 в эксперименте по восстановлению ТТХ. Зависимость экстинкции полученных спиртовых растворов формазана от концентрации клеток представлена на рисунке 1. Из рисунка 1 следует, что оптическая плотность спиртового раствора формазана, полученного после инкубирования микробной суспензии с ТТХ, пропорциональна количеству метаболически активных клеток, следовательно, данная реакция может лечь в основу разрабатываемого метода.

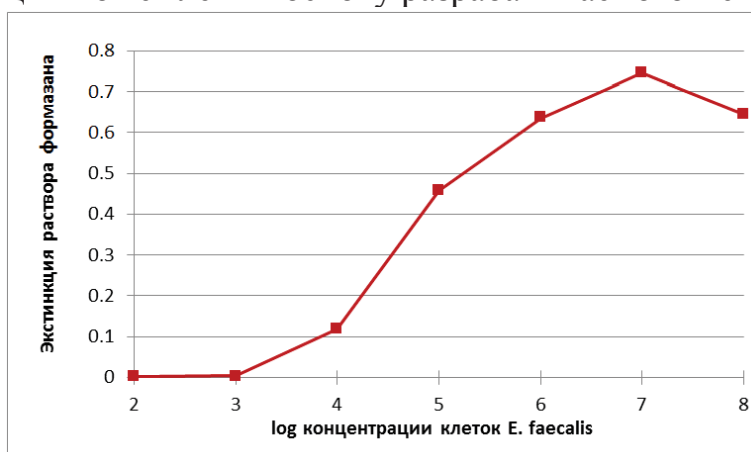


Рисунок 1 – Зависимость экстинкции спиртового раствора формазана от концентрации клеток *E. faecalis* M42.1.3

Для установления оптимальной продолжительности культивирования клеток с ТТХ провели следующий эксперимент: бактерии *E. faecalis* M42.1.3 культивировали с ТТХ в течение 8 ч, определяя каждый час экстинкцию растворов экстрагированного этанолом формазана. Полученная зависимость экстинкции спиртовых растворов формазана от длительности культивирования клеток представлена на рисунке 2.

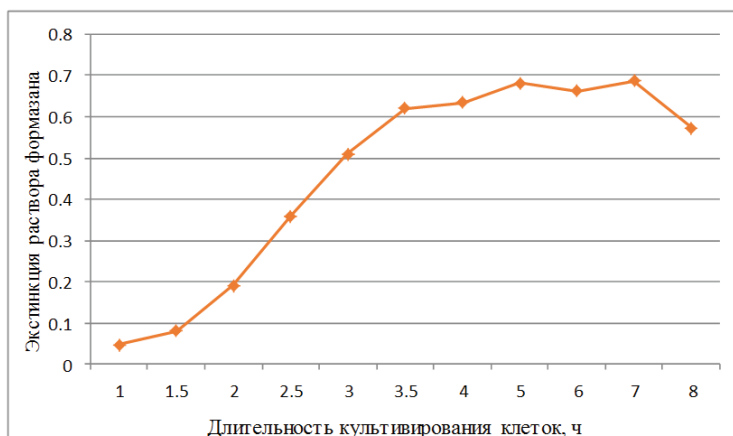


Рисунок 2 – Изменение экстинкции раствора формазана от длительности культивирования клеток *E. faecalis* M42.1.3

Из рисунка 2 видно, что после 3,5 ч инкубирования клеток с ТТХ оптическая плотность изменялась незначительно, следовательно, принимаем за оптимальную длительность культивирования 3,5 ч.

На следующем этапе исследования необходимо было доказать, что между антимикробной активностью известного препарата, в качестве которого использовали полигексаметиленгуанидин (ПГМГ), и количеством образующегося формазана существует зависимость. Для этого провели следующий эксперимент: бактерии *E. faecalis* M42.1.3 инкубировали в присутствии ПГМГ в различных концентрациях. После отмывания клеток от биоцида определяли их дыхательную активность. На рисунке 3 приведена экстинкция спиртовых растворов формазана, образованного в результате восстановления ТТХ клетками бактерий после воздействия на них ПГМГ.

Из данных на рисунке 3 следует, что с уменьшением концентрации ПГМГ увеличивается экстинкция растворов формазана, что свидетельствует о возрастании дыхательной активности бактерий. Можно предположить, что повышение концентрации ПГМГ в питательной среде приводит к снижению числа жизнеспособных клеток. И, следовательно, уменьшается количество редуктаз, что приводит к снижению скорости образования формазана.

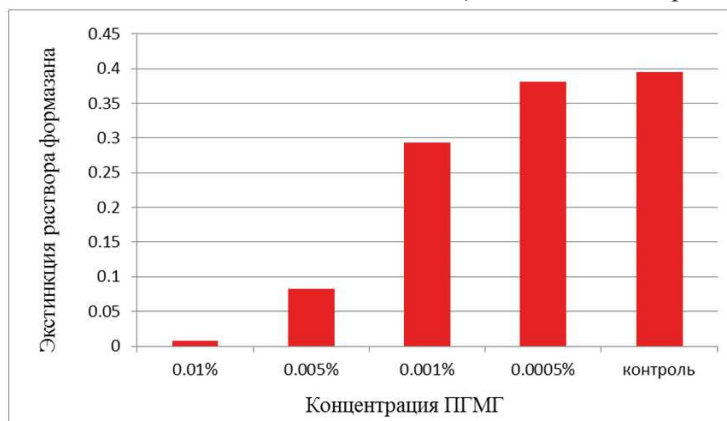


Рисунок 3 – Экстинкция растворов формазана после культивирования клеток *E. faecalis* M42.1.3. с ПГМГ и ТТХ.

На последующем этапе исследования планируется адаптировать данный метод для оценки окислительно-восстановительной активности клеток в составе биопленок.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. W. Costerton Bacterial biofilms in nature and disease / J. W. Costerton [et al]. // Ann. Rev. Microbiol. - 1987. - №41. – P.435-439.
2. John L. Pace Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy / John L. Pace [et al]. // CRC Press Taylor & Francis Group. - 2006. – 520 p.
3. Государственная система стандартизации Республики Беларусь. Молоко и продукты его переработки. Методы микробиологического анализа: ГОСТ Р 53430-2009. – Введ. 14.09.09. – Минск : Госстандарт : Белорус. гос. ин-т станд-ии и сертификации, 2009. – 12 с.
4. Peeters, E. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates / Elke Peeters // Journal of Microbiological Methods. – 2008. – Vol. 72, №2. – P. 157-165.