

Исследование формирования биопленок *Candida albicans* и *Escherichia coli*

Н.П. Сачивкина¹, Е.М. Ленченко², А.И. Марахова¹

¹Российский университет дружбы народов;

Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

²Московский государственный университет пищевых производств;

Российская Федерация, 125080, Москва, Волоколамское ш., д. 11

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сачивкина Надежда Павловна – доцент кафедры микробиологии и вирусологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (919) 962-63-09. E-mail: sachivkina@yandex.ru

Ленченко Екатерина Михайловна – профессор кафедры ветеринарной медицины Московского государственного университета пищевых производств, доктор ветеринарных наук. Тел.: +7 (905) 741-99-86. E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru

Марахова Анна Игоревна – заведующая лабораторией научно-образовательного центра «Нанотехнологии» Российского университета дружбы народов, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 600-65-95. E-mail: agentcat85@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Биопленки являются формой микробных сообществ, фиксированных на различных абиотических и биотических поверхностях. Этот способ существования микроорганизмов создает большие проблемы в фармацевтической, медицинской, ветеринарной практике. Создание микроорганизмами биопленок делает их недостижимыми для подавляющего большинства антимикробных средств. Существование биопленок при хронических инфекциях требует совершенно новых подходов к лечению. Некоторые механизмы формирования и поддержания определенных типов биопленок еще не вполне ясны.

Цель работы – сравнительная оценка и подбор эффективных методов изучения структурно-функциональных особенностей формирования биопленок микроскопическими грибами и бактериями для дальнейшей разработки эффективных фармакологических препаратов.

Результаты. Исследованы структурно-функциональные особенности непатогенных штаммов микроскопических грибов рода *Candida* и бактерий *Escherichia coli* на способность образовывать биопленки по новому модифицированному методу. Разработан простой и экономичный способ получения биопленок, который позволяет изучить роль процесса трубкообразования в сообществах *Candida* – *Escherichia*.

Заключение. Предложенная модель может быть использована для изучения терапевтического воздействия различных лекарственных препаратов на биопленки и механизмы их первоначальной адгезии.

Ключевые слова: микроскопические грибы, бактерии, биопленки, адгезивные свойства, матрикс, микроскопия.

Для цитирования: Сачивкина Н.П., Ленченко Е.М., Марахова А.И. Исследование формирования биопленок *Candida albicans* и *Escherichia coli*. Фармация, 2019; 68 (7): 26–30. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-07-05>

STUDY OF THE FORMATION OF *CANDIDA ALBICANS* AND *ESCHERICHIA COLI* BIOFILMS

N.P. Sachivkina¹, E.M. Lenchenko², A.I. Marakhova¹

¹Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklai St., Moscow 117189, Russian Federation;

²Moscow State University of Food Production, 11, Volokolamskoe Sh., Moscow 125080, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Sachivkina Nadezhda Pavlovna – Associate Professor of Microbiology and Virology Department, Medical Faculty, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), PhD. Tel.: +7 (919) 962-63-09. E-mail: sachivkina@yandex.ru

Lenchenko Ekaterina Mikhailovna – Professor of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Production, Doctor of Veterinary Sciences. Tel.: +7 (905) 741-99-86. E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru

Marakhova Anna Igorevna – Head of the Department of Scientific-educational Centre «Nanotechnologies» IBCTN (SEC «Nanotechnologies»), RUDN University, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 600-65-95. E-mail: agentcat85@mail.ru

SUMMARY

Introduction. Biofilms are a form of microbial communities fixed onto various abiotic and biotic surfaces. This way in which the microorganisms exist creates major problems in pharmaceutical, medical, and veterinary practice. The creation of biofilms by microorganisms makes them inaccessible to the vast majority of antimicrobial agents. The existence of biofilms in chronic infections requires entirely new treatment approaches. Some mechanisms for the formation and maintenance of certain types of biofilms are not yet completely clear.

Objective: to comparatively assess and select effective methods for studying the structural and functional features of the formation of biofilms by microscopic fungi and bacteria for the further design of effective pharmacological preparations.

Results. The investigators studied the structural and functional features of non-pathogenic strains of microscopic fungi of the genus *Candida* and bacteria *Escherichia coli* on the ability to form biofilms by a new modified method. A simple and economical method for producing biofilms was developed, which allows one to study the role of the tube formation process in *Candida-Escherichia* communities.

Conclusion. The proposed model can be used to study the therapeutic effect of various drugs on biofilms and the mechanisms of their initial adhesion.

Key words: microscopic fungi, bacteria, biofilms, adhesive properties, matrix, microscopy.

For citation: Sachivkina N.P., Lenchenko E.M., Marakhova A.I. Study of the formation of *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *Farmatsiya* (Pharmacy), 2019; 68 (7): 26–30. <https://doi.org/10/29296/25419218-2019-07-05>

Введение

Биопленки являются формой микробных сообществ, фиксированных на различных абиотических и биотических поверхностях. В природе они распространены повсеместно и состоят из микробных клеток и внеклеточного матрикса. Изучение биопленок в настоящее время вызывает огромный интерес исследователей, так как этот способ существования микроорганизмов создает большие проблемы для фармацевтической, медицинской, ветеринарной практики [1]. Например, бактерии в биопленках могут обмениваться плазмидами резистентности к лечебным препаратам, а также они не поддаются воздействию иммунной системы хозяина [2]. Микроорганизмы в биопленках создают свои «государства», где они живут и размножаются, а при благоприятных условиях выходят в организм, способствуя новому витку заболевания. Представления о биопленках, подтвержденные с помощью современных методов визуализации, изменили взгляды на заболевания в целом. Согласно последним исследованиям, хронические инфекции принципиально отличаются от острых, а существование биопленок при хронических инфекциях требует совершенно новых подходов к их лечению [3].

Известно, что существуют различия бактерий в составе биопленок и планктонно растущих, которые проявляются в метаболической активности, скорости роста, наличии каналов в матриксе и т.д. Однако некоторые механизмы формирования и поддержания определенных типов биопленок еще не вполне ясны: Кто играет первостепенную роль в биопленочных сообществах *Candida-Escherichia*. Могут ли образовывать биопленки непатогенные штаммы?

Известно, что любой инфекционный процесс начинается с адгезии возбудителя на клетках-мишенях. Потенциальную патогенность *S. albicans* принято характеризовать проявлением факторов вирулентности, основанных на физиологических особенностях клетки и характере ее взаимодействия с макроорганизмом [4]. Долгое время считалось, что образование герминативных, т.е. зародышевых или проростковых, трубок у кандид служит одним из основных факторов патогенности, приводящим к развитию кандидоза, поскольку трубкообразующие штаммы обладают более выраженной способностью прикрепляться к органическим и неорганическим субстратам [5]. В настоящее время установлена четкая корреляция между способностью кандид к трубкообразованию и его вирулентностью в эксперименте. Однако, как считают некоторые авторы, 10–15% выделяемых от пациентов *S. albicans* не способны к воспроизведению герминативных трубок [6].

Лечение хронических инфекций в настоящее время уже не может основываться на традиционной концепции микробиологии. Новые представления о биопленках требуют разработки антимикробных препаратов нового поколения.

Цель работы – сравнительная оценка и подбор эффективных методов изучения структурно-функциональных особенностей формирования биопленок микроскопическими грибами и бактериями для дальнейшей разработки эффективных фармакологических препаратов.

Материал и методы

В опытах использовали культуры микроорганизмов: *Candida albicans*, клинический штамм,

выделенный от собаки с бессимптомной формой вагинального кандидоза; *Escherichia coli* (*E. coli*) «Эколюм» представляют собой лиофилизированные культуры люминесцентных непатогенных бактерий, содержащиеся в среде инертных газов в стеклянных флаконах производства НВО «Иммунотех».

Тест «проростковая проба» – один из основных методов идентификации *C. albicans*. Такое исследование морфологии микроскопических грибов проводится на специальных средах, так как все выросшие на стандартных средах грибы выглядят одинаково – в виде округлых почкующихся клеток. С целью стимуляции специфических репродуктивных структур (конидий), а также элементов мицелия (псевдогифы) применяют специальные среды, зачастую обедненные питательными веществами: кукурузный агар с добавкой твин-80, рисовый агар, картофельно-морковный агар с желчью и др. [7]. В данном исследовании кандиды культивировали на плотной среде Сабуро с добавлением пенициллина и стрептомицина 100 ЕД/л или на рисовом агаре

(Rice Extract Agar, Франция); эшерихии – на среде Эндо (ЭНДО-ГРМ, Россия).

Для исследования морфологии микроорганизмов на поверхность рисового агара, сред Сабуро и Эндо наливали сверху 1 мл сердечно-мозгового бульона (СМБ), в бульон вносили по 0,1 мл чистых бульонных культур *E. coli* и *C. albicans* с титром 10^6 КОЕ/мл и смешанную взвесь указанных микроорганизмов. Стерильное покровное стекло помещали на поверхность агара с помощью пинцета, шпателем распределяли культуры так, чтобы они и жидкая среда попали сверху на стекло (рис 1). Микроорганизмы культивировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Аккуратно пинцетом снимали покровные стекла и фиксировали смесью Никифорова (спирт – эфир 1:1) в течение 10 мин. Фиксированный мазок окрашивали 1% раствором метиленового синего в течение 3 мин. После промывания и подсушивания окрашенное покровное стекло помещали на предметное стекло мазком вниз, а между ними наносили 1 каплю иммерсионного масла. Такая методика приготовления био пленок не встречалась нами ни в отечественных, ни в зарубежных источниках [8].

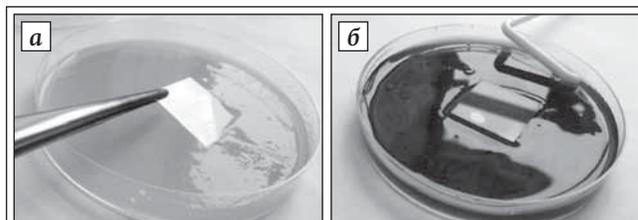


Рис. 1. Приготовление био пленок:
а – наложение стекла на среду; б – распределение
сверху 1 мл сердечно-мозгового бульона
Fig. 1. Preparation of biofilms:
а – overlaying the medium with glass; б – above
distribution of 1 ml of brain-heart-infusion broth

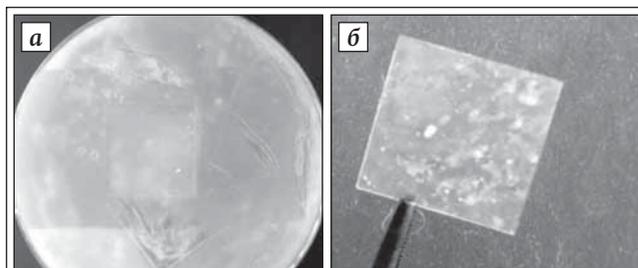


Рис. 2. Био пленки *Candida albicans*
на рисовом агаре: а – в чашке Петри;
б – на предметном стекле
Fig. 2. *Candida albicans* biofilms
on rice extract agar: а – in a Petri dish;
б – on a glass slide

Результаты и обсуждение

При культивировании газом на плотной среде Сабуро *C. albicans* формировала равномерный газон. Однако такой «газон» вырос на поверхности агара, а на поверхности стекла рост был весьма скудный. При микроскопировании таких препаратов видны были одиночные клетки дрожжеподобных грибов (ДПГ) овальной или удлинено-овальной формы размером от 3 до 10 мкм. Считать такой рост био пленкой невозможно.

Известно, что рисовый агар индуцирует трубнообразование и служит для определения хламидоспор ДПГ. Для этого готовые одноразовые ампулы с рисовым агаром подогревали на водяной бане и разливали в чашки Петри. После инкубации на чашках с рисовым агаром рост микроорганизмов наблюдался не только на поверхности среды, но и на покровном стекле (рис 2). Это можно объяснить тем, что активность образования герминативных трубок у *C. albicans* на рисовом агаре высока и ДПГ образовывали сеть клеток, сцепленных между собой. Морфологически под микроскопом эти образования выглядели как типичные био пленки (рис. 3). Они состояли как из дрожжевых форм, так и трубнообразующих, которые подобно корням деревьев удержи-

вали овальные клетки. При подсчете в 100 полях зрения микроскопа количество ДПГ в мицелиальной форме относительно общего числа клеток составило $28 \pm 12\%$.

Культивирование *E. coli* на агаре Эндо дало тот же эффект, что и кандид на среде Сабуро. Под микроскопом видны были редкие одиночные палочки с закругленными концами длиной 1–2 мкм.

Картина полностью поменялась, когда было проведено совместное культивирование 2 микроорганизмов на рисовом агаре. Высокое содержание длинных гифальных нитей кандид привело к тому, что эшерихии удержались и размножились на стекле в большом количестве. Непосредственно образовалась плотная биопленка, состоящая из клеток и матрикса.

Таким образом, при формировании биопленок существенную, а порой и ключевую роль, играют морфологические формы микроорганизмов. Оптимальное решение для эффективного культивирования биопленок *C. albicans* и *E. coli* – стимуляция сначала трубкообразования у *C. albicans*, что обеспечит хорошее прилипание к абиотическим поверхностям всей конструкции. Такая организация обеспечивает физиологическую и функциональную стабильность и, следовательно, выживание в экологической нише. Пока нельзя утверждать, что эта модель (ДПГ+бактерии) будет работать абсолютно со всеми микроорганизмами. Для этого нужно провести серию экспериментов сочетания кандид и морфологически разных бактерий. Вероятно, похожие результаты совместного культивирова-

ния биопленок будут получаться с палочковидными бактериями того же размера, как *E. coli*. Гифообразование, как важнейший критерий патогенности кандид в организме [9] и обязательный этап для предложенного метода создания биопленок, можно моделировать и другими способами. Например, с помощью бычьей сыворотки или в жидкой питательной среде Spider-medium [10, 11].

Заключение

Предложенная методика формирования биопленок *Candida–Escherichia* может быть использована для оценки влияния различных лекарственных препаратов и их дозировок на устойчивость микроорганизмов-симбионтов. Терапевтическое воздействие таких препаратов может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии биопленки, блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией. Кроме того, оно может сочетаться с собственно антимикробными агентами. Подобное лечение, действующее на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная и антимикотическая терапия.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Abdullahi, Umar Faruk. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Veterinary World*, 2016; 9 (1): 12–8.
2. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? *Практическая медицина*, 2011; 53: 7–10.
3. Lebeaux D., Chauhan L., Rendueles O., Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*, 2013; 26: 288–56.
4. Ленченко Е.М., Антонова А.Н. Исследование биопленок и фенотипических признаков бактерий. *Ветеринария*, 2017; 10: 31–4.
5. Ramage G., VandeWalle K., Wickes B.L., López-Ribot J.L. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45 (9): 2475–9.
6. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: Триада – X, 2001; 472.
7. Nett J., Andes D.R. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006; 9:340–345.

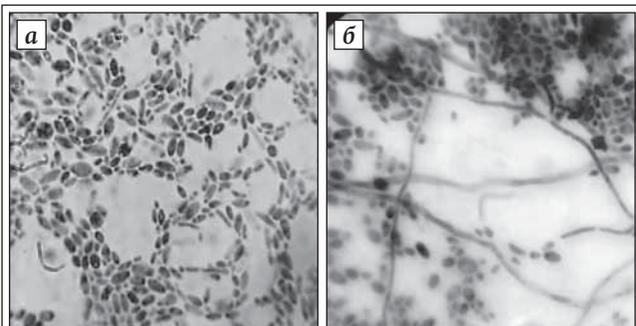


Рис. 3. Биопленки *Candida albicans* на рисовом агаре, окраска метиленовой синью. Оптическая микроскопия (ок. 10, об. 40): а – 24 ч инкубации; б – 36 ч инкубации

Fig. 3. *Candida albicans* biofilms on rice extract agar, methylene blue staining. Optical microscopy (approx. 10, vol. 40): а – 24-hour incubation; б – 36-hour incubation

8. Сачивкина Н.П., Ленченко Е.М., Маннапова Р.Т., Стрижаков А.А., Романова Е.В., Лукина Д.М. Моделирование биопленок *Candida*: прошлое и настоящее. Фармация, 2019; 68 (3): 18–22. DOI:10/29296/25419218-2019-03-03

9. Хайтович А.Б., Гаффарова А.С. Факторы патогенности *Candida albicans* и определение их генных детерминант. Таврический медико-биологический вестник, 2016; 19 (3): 121–6.

10. Сачивкина Н.П., Куликов Е.В. Образование герминативных трубок у кандид с высокой степенью адгезии. Успехи медицинской микологии, 2016; XV: 33–5.

11. Чеботарь И.В., Паршиков В.В. Исследование действия антимикотических препаратов на биопленки, сформированные грибами рода *Candida*. Акушерство и гинекология, 2013; 5: 98–102.

References

1. Abdullahi, Umar Faruk. Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. VeterinaryWorld, 2016; 9 (1): 12–8.

2. Mal'tsev S.V., Mansurova G.Sh. What is biofilm? Prakticheskaya meditsina, 2011; 53: 7–10 (in Russian)

3. Lebeaux D., Chauhan L., Rendueles O., Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. Pathogens, 2013; 26: 288.

4. Lenchenko E.M., Antonova A.N. The study of biofilms and phenotypic signs of bacteria. Veterinariya, 2017; 10: 31–4 (in Russian).

5. Ramage G., VandeWalle K., Wickes B.L., López-Ribot J.L. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing

of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother, 2001; 45 (9): 2475–9.

6. Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Candidiasis. The nature of the infection, the mechanisms of aggression and defense, laboratory diagnostics, clinic and treatment. Moscow: Triada-X, 2001; 472 (in Russian).

7. Nett J., Andes D.R. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Curr. Opin. Microbiol., 2006; 9: 340–5.

8. Sachivkina N.P., Lenchenko E.M., Mannapova R.T., Strizhakov A.A., Romanova E.V., Lukina D.M. *Candida* Biofilm Modeling: Past and Present. Farmatsiya, 2019; 68 (3): 18–22. DOI: 10/29296/25419218-2019-03-03 (in Russian).

9. Khaitovich A.V., Gaffarova A.S. Pathogenicity factors of *Candida albicans* and determination of their gene determinants. Tavrisheskiy mediko-biologicheskii vestnik, 2016; 19 (3): 121–6 (in Russian).

10. Sachivkina N.P., Kulikov E.V. Formation of germinal tubes in *Candida* with a high degree of adhesion. Uspekhi meditsinskoy mikologii, 2016; XV: 33–5 (in Russian).

11. Chebotar' I.V., Parshikov V.V. Investigation of the effect of antimycotic drugs on biofilms formed by *Candida* species. Akusherstvo i Ginekologiya, 2013; 5: 98–102 (in Russian).

Поступила 2 августа 2018 г.

Received 2 August 2018

Принята к публикации 25 февраля 2019 г.

Accepted 25 February 2019