

В.М. Лахтин, А.Л. Байракова, М.В. Лахтин, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин

МОДУЛИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК МИКРОБНЫМИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ КОНСОРЦИУМАМИ ЧЕЛОВЕКА: КОНЦЕПЦИЯ РАСШИРЕННОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО КОМПАРТМЕНТА БИОТОПА, ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ПАТТЕРНЫ

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

Целью работы была разработка скринингового визуального и количественного метода отбора штаммов и потенциальных консорциумов нормофлоры человека (в том числе пробиотической направленности) для создания в будущем новых синбиотических, симбиотических и безклеточных профилактических и лекарственных форм, значимых для терапии внутриполостных болезней. Использовали штаммы дрожжей *Candida* и лактобацилл *Lactobacillus*, выделенные из нормофлоры урогенитального биотопа здоровых доноров. Суспензии штаммов с оптической мутностью 1 ед. по МакФарланду добавляли в возрастающих дозах в лунки полистироловой микропанели с избытком бульона MRS (варианты А, В, С, D и E) и инкубировали 48 ч при 37 °С. Образовавшиеся биопленки окрашивали генциан-виолетом и дно лунок микропанели фотографировали и сканировали. Оптическую плотность фиксированных этанолом биопленок с красителем в лунках регистрировали на ридере с использованием светофильтра 620 нм. Визуально оценивали влияние рассасывающей биопленку активности (РБА) и противоположное действие полисахаридов и других адгезинов. Для оценки ранжирования выраженности роста биопленок в монокультурах нами предложено использование расчетного коэффициента $(D+E)/(B+C)$, отражающего спрямление и снижение крутизны наклона дозовой зависимости оптической плотности в серии разведений микробных суспензий. Результаты позволяют проводить мониторинг раннего пленкообразования штаммами микроорганизмов и их смесями. Микропанель удобна для получения прогностических паттернов взаимовлияния на пленкообразование сосуществующих в биотопе консорциумов популяций микроорганизмов и оценки здорового статуса биотопных микробиоценозов человека. Возможен отбор биосовместимых с организмом человека штаммов и их смесей пробиотической направленности, представляющих интерес для профилактики и терапии – антибиопленочной, антипатогенной, ферментной, альтернативной антибиотикам, поддерживающей вспомогательной и комбинированной.

Ключевые слова: дрожжи, лактобациллы, микробиоценозы, нормофлора, биотоп, паттерны

MODULATION OF BIOFILMS BY MICROBIAL POTENTIAL CONSORTIA OF HUMAN: CONCEPTION OF EXTENDED PROBIOTIC COMPARTMENT OF BIOTOPE, PROGNOSTIC PATTERNS

V.M. Lakhtin, A.L. Bajrakova, M.V. Lakhtin, A.V. Aleshkin, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow

The purpose of the investigation was development of screening visual and quantitative method of strain selection and potential consortium of normal human microflora (including one of probiotic orientation) for future creation of new synbiotic, symbiotic and acellular prophylactic and medicinal forms significant for therapy of endoceliac diseases. We used strains of yeast *Candida* and lactobacilli *Lactobacillus*, isolated from normal microflora of urogenital biotope of healthy donors. Suspensions of strains with turbidity 1 unit of Mcfarland standards were added with increasing doses to wells of polystyrene micropanels with surplus of MRS broth (variants A, B, C, D and E) and incubated 48 hours at 37 °C. Cultivated biofilms were stained with gentian violet and bottoms of wells in micropanels were photographed and scanned. Optical density of ethanol fixated stained biofilms in wells was registered with colour filter 620 nm. Visual evaluation was performed of influence of biofilm resolving activity and opposite action of polysaccharides and other adhesins. To assess ranging of expressiveness if biofilms growth in monocultures we suggested to use calculated coefficient $(D + E)/(B + C)$, which reflects rectifying and decreasing of gradient of slope of dosage dependence of optical density in series of cultivations of microbial suspensions. The results make possible to perform monitoring of early film formation by strains of microorganisms and their mixtures. Micropanel is convenient for getting prognostic patterns of interference on film formation of co-existing in biotope consortiums of microorganisms populations and for evaluation of health status of biotope human microbiocenoses. It is possible to select strains biocompatible with human organism and their mixtures of probiotic orientation which are of great interest for prevention and therapy antibiofilm, antipathogenic, enzymatic, alternative to antibiotics, supporting adjuvant and combined.

Key words: yeasts, lactobacilli, microbiocenoses, normoflore, biotope, patterns

ВВЕДЕНИЕ

Перспективы развития пробиотикотерапии оцениваются как стратегические [2]. Индустриальные штаммы пробиотических микроорганизмов являются источником многих полезных эффектов [4–6]. Пробиотические бактериальные

факторы (меж)клеточной адгезии препятствуют пролонгированию резистентных к антибиотикам микробных ассоциатов и биопленок, усиливают системную антипатогенную активность [7, 10]. Нормофлора биотопа человека характеризуется как саморегулирующаяся система, как в случае лак-

тобациллярного потенциального синбиотического компартмента [9]. Скрининг нормофлоры человека в отношении способности к образованию биопленок и их деградации является актуальной задачей.

Цель — разработать скрининговый визуальный метод отбора штаммов и потенциальных консорциумов нормофлоры человека (в том числе пробиотической направленности) для создания новых синбиотических, симбиотических и безклеточных лекарственных форм, значимых для профилактики и терапии внутрисполостных болезней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дрожжи *Candida* (штаммы Y1, ... Y8) и лактобациллы *Lactobacillus* (штаммы L1, ... L12) выделены из нормофлоры урогенитального биотопа здоровых доноров (при обследовании в клиничко-диагностическом центре Института им. Г.Н. Габричевского нарушения биотопа отсутствовали) стандартными методами, в том числе с использованием агара Сабуро или *Lactobacillus* MRS Agar (HiMedia) в анаэробных условиях (анаэробных генбоксах (GENbox, BioVerieux, Франция). Использовали также среду *Shaedler* на агаровой основе, цветные среды для видовой идентификации кандид (HiMedia, Индия). Были идентифицированы *C. albicans* (штаммы Y1-Y4), *C. tropicalis* (штаммы Y5, Y6 и Y8) и *C. krusei* (штамм Y7). По данным использования стандартных наборов диск-антибиотиков (HiMedia, Индия) дрожжи проявляли чувствительность к нистатину, амфотерицину и клотримазолу, а лактобациллы — к таким антибиотикам гинекологического ряда как цефазолин, цефатоксим, доксициклин, рокситромицин и ампициллин. Оптическую плотность культур в физрастворе измеряли на денситометре (Densi-la-Meter, Erba Lachema, Чешская Республика). Свежеприготовленные суспензии штаммов с оптической мутностью 1 ед. по МакФаррелу добавляли раздельно или парами Y-L (в равных соотношениях, в общем объеме 20, 40, 60, 80 или 100 мкл в 280, 260, 220 или 200 мкл стандартного бульона MRS: варианты А, В, С, D и E, соответственно) по 150 мкл в лунки 96-луночной полистироловой микропанели (Nunc Nunclon, Sigma, США) или стриповой пластиковой микропанели (ООО «Биомедикал», РФ). Микропанели инкубировали 48 ч при 37 °С. Жидкость вытряхивали, лунки промывали физраствором и дистиллированной водой и окрашивали генциан-виолетом (НИЦФ, Санкт-Петербург). После удаления избытка красителя и промывки лунок цветные биопленки культур фотографировали фотоаппаратом Cannon-12.1 мегапикселей, сканировали на приборе HP Deskjet F2187. Оптическую плотность фиксированных этанолом биопленок с красителем в лунках регистрировали на ридере с вертикальным лучом света с использованием светофильтра 620 нм. Для оценки ранжирования выраженности роста биопленок в монокультурах нами предложено использование расчетных коэффициентов $(D + E)/(B + C \pm A)$, отражающих спрямление и снижение крутизны наклона дозой зависимости оптической плотности в серии

разведений микробных суспензий А, В, С, D и E. Визуально оценивали влияние рассасывающей биопленки активности (РБА) и противоположное действие полисахаридов и других адгезинов [1, 3]. Все результаты усредняли по трем и более измерениям и оценивали достоверность различий по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В случае микропанели Nunc Nunclon биопленки лучше сорбировались и окрашивались. Коэффициент $(D + E)/(B + C)$ лучше воспроизводился (меньше варьировал). В целом, дрожжи в большей степени были склонны к пленкообразованию. Образование пленок монокультурами снижалось в рядах: Y1(1.619) > Y4(1.381) > Y2(1.093) > Y5(1.050) > Y3(0.901) > Y8(0.563) > Y6(0.502) > Y7(0.452); L11(0.954) > L7(0.930) > L10(0.919) > L4(0.898) > L9(873)] > L12(847)] > L8(837) = L6(838) > L5(792) > L3(775) > L1(752) > L2(635).

Наблюдались полисахаридные агрегаты, неравномерно распределенные на поверхности биопленки и по ее краям в случае штаммов Y7 > Y8, Y6, а также РБА — в случае штаммов Y1, Y3, Y2 (все относятся к виду *C. albicans*). В случае лактобацилл РБА регистрировалась у штаммов L10, L9, L3, L6 и L5, а полисахаридные факторы — у штаммов L11, L9, L10 и L1. В смешанных парных культурах порядок ранжирования пленкообразования менялся для каждого штамма Y (в зависимости от особенностей консорциума 12 штаммов L), а для каждого штамма L — в зависимости от особенностей консорциума 8 штаммов Y. В смешанных культурах (табл. 1) способность образовывать пленки снижалась: а) под влиянием потенциального консорциума 12 штаммов лактобацилл на отдельные штаммы дрожжей: Y7 > Y1 > Y8 > [Y3, Y2] > Y6 > [Y5, Y4]; б) под влиянием потенциального консорциума 8 штаммов дрожжей на отдельные штаммы лактобацилл: L8 > L12 > L11 > L9 > L1 > L7 > L10 > [мало различающиеся штаммы в группе со слабым или отсутствующим пленкообразованием: L6, L5, L3, L2 и L4]. В сравнении с монокультурами имело место модулирование биопленок в смешанных парных культурах дрожжи-лактобациллы (табл. 1). Наблюдалось снижение пленкообразования штаммами Y2, Y4 и Y5 под влиянием потенциального пробиотического консорциума (12 штаммов лактобацилл), а также снижение пленкообразования штаммами L11, L7 и L10 под влиянием потенциального консорциума 8 штаммов кандид, изолированных из здоровых биотопов одного и того же типа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные демонстрируют преимущественную способность образовывать равномерные протяженные однородные биопленки в ряду монокультур видов кандид: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei*. Наличие гидролитического потенциала (РБА) объединяет виды *C. albicans* и *C. tropicalis* и отличает от *C. krusei* [12]. Хотя РБА биопленок монокультур кандид хуже регистрировалась в

Таблица 1

Пленкообразование парными смешанными культурами кандид и лактобацилл

№ шт.	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L1-12
Y1	170 ± 49	110 ± 22	128 ± 80	100 ± 77	120 ± 37	92 ± 91	138 ± 94	914 ± 411	253 ± 89	228 ± 17	223 ± 205	342 ± 23	235 ± 226
Y2	145 ± 57	113 ± 17	95 ± 8	62 ± 38	94 ± 33	60 ± 48	131 ± 105	376 ± 193	250 ± 75	189 ± 16	342 ± 231	229 ± 20	174* ± 106
Y3	174 ± 74	74 ± 68	58 ± 42	54 ± 33	108 ± 36	10 ± 9	137 ± 132	640 ± 436	190 ± 34	96 ± 22	295 ± 185	305 ± 16	178* ± 172
Y4	105 ± 26	41 ± 39	64 ± 59	36 ± 33	69 ± 1	12 ± 7	78 ± 35	291 ± 32	168 ± 18	100 ± 60	90 ± 61	108 ± 99	97* ± 73
Y5	117 ± 37	55 ± 54	53 ± 31	38 ± 33	70 ± 37	24 ± 21	85 ± 25	314 ± 97	136 ± 54	50 ± 20	100 ± 43	160 ± 97	100* ± 79
Y6	143 ± 53	47 ± 37	94 ± 35	42 ± 23	72 ± 35	39 ± 14	128 ± 71	319 ± 149	159 ± 61	82 ± 39	207 ± 114	268 ± 13	133* ± 91
Y7	347 ± 253	224 ± 77	279 ± 158	304 ± 183	331 ± 25	219 ± 49	335 ± 128	366 ± 185	306 ± 12	198 ± 99	483 ± 323	522 ± 18	*326 ± 98
Y8	187 ± 57	120 ± 26	147 ± 34	97 ± 80	82 ± 39	114 ± 75	209 ± 81	603 ± 285	198 ± 95	162 ± 84	175 ± 97	165 ± 12	188* ± 137
Y1-8	*173* ± 75	98* ± 60	115* ± 74	92* ± 89	118* ± 88	71* ± 70	*155* ± 83	*477 ± 220	*208* ± 57	138* ± 64	*239* ± 131	*262* ± 130	—

Примечание: даны значения $D_{620} \times 10^3$ (за вычетом фона) поглощения красителя в лунках микропанели (Nunc Nunclon, Sigma, США). Ряды соответствуют дрожжевым формам штаммов кандид, а столбцы – штаммам лактобацилл. Для каждой лунки 96-луночной микропанели усреднены значения результатов, полученных в условиях А, С и D (см. раздел Материалы и методы). Наличие биопленок в лунках подтверждено фотографиями микропанели. * – достоверность различия ($p < 0,05$) в сравнении с максимально или минимально выраженной биопленкой в ряду или столбце («справа*» – сравнение с максимальной биопленкой, «*слева» – сравнение с минимальной биопленкой).

сравнении с монокультурами лактобацилл, РБА в случае *C. albicans* была выражена. В то же время полисахаридная поверхность дрожжей двух групп (*C. albicans* + *C. tropicalis*, *C. krusei*) различается по нашим данным в отношении сродства к маннан- и муцин-связывающим лектинам пробиотических штаммов бактерий человека (лактобацилл и бифидобактерий) [8]. По-видимому, в инициации адгезии и росте ранних биопленок на гидрофобных поверхностях белковые и/или липидсодержащие адгезины принимают доминирующее участие в сравнении с более гидрофильными полисахаридными факторами. Выявленные штаммы монокультур дрожжей и лактобацилл, способные снижать пленкообразование смешанными культурами, а также пары штаммов L и Y с отсутствующим или слабым пленкообразованием (табл. 1, также по данным фотографий микропанельного прогностического паттерна) являются потенциальными антагонистами микробных ассоциатов и биопленок *in vivo*, заместителями (условно) патогенных ранних биопленок в микробиоценозах биотопов человека. Взаимовлияние дрожжей и лактобацилл в смешанных культурах указывает на наличие коммуникационных ранних сигналов, как со стороны дрожжей, так и со стороны лактобацилл (появляются уже через 5–7 часов культивирования в питательной среде), в том числе участвующих в образовании ассоциативных обратимых (поддающихся ресуспендированию в течение первых суток согласно нашим данным) клеточных биопленок. К таким сигналам могут относиться лектины – регуляторы клеточного метаболизма, модуляторы активности ферментов всех известных классов [5]. Антибиопленочными сигналами, как показано нами, могут быть лектины внутриполостных пробиотических бактерий человека – имитаторы пробиотиков [13], относящиеся к новому классу деструкторов биопленок условно патогенных микроорганизмов

человека и являющихся членами нового функционального семейства симбиотических микроорганизмов [10, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенные подходы к мониторингу раннего пленкообразования эукариотическими и прокариотическими штаммами микроорганизмов и их смесями полезны для оценки здорового статуса биотопных микробиоценозов человека, отбора новых источников для клеточной и молекулярной терапии (антибиопленочной, антипатогенной, альтернативной антибиотикам, иммуномодуляторной, ферментной, цитокиновой, поддерживающей вспомогательной, комбинированной). Разработанный скрининговый метод поможет конструированию расширенных по составу и спектру действия каскадных пролонгированных сетевых с повышенной надежностью пробиотических консорциумов и компартментов. Получаемые с помощью метода визуальные паттерны биопленок монокультур и смешанных культур в микропанели являются прогностическими, которые могут помочь в качестве дополнительного критерия при диагностике ранних нарушений (дисбиотических и патологических) нормофлоры человека, а также при выборе средств комбинированной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лахтин В.М., Корсун В.Ф., Лахтин М.В., Корсун Е.В. Изучение цитоагглютинирующих активностей (фитолектиновой, расщепляющей агглютинаты и агглютинирующей цветными примесями) // Прак. фитотер. – 2004. – № 3. – С. 9–16.
2. Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В. и др. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего // Вестник РАМН. – 2008. – № 2. – С. 33–44.

3. Лахтин В.М., Лахтин М.В., Корсун В.Ф., Шендеров Б.А. Совместный потенциал лектинов пробиотических микроорганизмов и грибов в условиях организации и функционирования модельных эукариотических клеточных биопленок — для дальнейшего использования в клинической практике в составе фитокомпозиций // *Практ. фитотер.* — 2008. — № 2. — С. 11 — 17.

4. Лахтин В.М., Лахтин М.В., Агапова Ю.В., Беликова Ю.В. и др. Преимущества пробиотического консорциума «Ацилакт» в сравнении с ингредиентными штаммами с использованием алгоритма ранжирования качеств // *Научное пространство Европы: сб. материалов международной НПК, 7 — 15 апреля, 2012, Польша.* — Т. 32. — С. 50 — 57.

5. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С. и др. Лектины и ферменты в биологии и медицине. — М.: Династия, 2010. — 496 с.

6. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Несвижский Ю.В. и др. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма // *Вестник РАМН.* — 2010. — № 2. — С. 3 — 8.

7. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Галимзянов Х.М. и др. Поведение патогенных грибов рода *Candida* разных видов в присутствии пробиотических лектинов // *Астраханский медицинский журнал.* — 2011. — № 2. — С. 73 — 76.

8. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Афанасьев С.С. и др. Поведение *Candida tropicalis*

и *Candida krusei* в присутствии пробиотических лектинов // *Астраханский медицинский журнал.* — 2011. — № 3. — С. 97 — 101.

9. Лахтин М.В., Байракова А.А., Лахтин В.М., Алешкин А.В. и др. Кофункционирование лектинов мультикомпонентного пробиотика и потенциального пробиотического компартмента биотопа на примере авторегуляторной лактобациллярной системы // *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН.* — 2012. — № 5 (87), Ч. 1. — С. 250 — 253.

10. Lakhtin M., Aleshkin V., Lakhtin V., Afanasiev S. et al. Probiotic lactobacillus and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* clinical strains: new class of pathogen biofilm destructors // *Probiotics & Antimicrobial Proteins.* — 2010. — Vol. 2, N 3. — P. 186 — 196.

11. Lakhtin M., Lakhtin V., Aleshkin V., Afanasiev S. Lectins of beneficial microbes: system organization, functioning and functional superfamily // *Beneficial Microbes.* — 2011. — Vol. 2, N 2. — P. 155 — 165.

12. Lakhtin M., Lakhtin V., Bajrakova A., Aleshkin A. et al. Interaction of probiotic bacterial lectins to *Candida* species // *Materiály VIII mezinárodní vědecko-praktická conference «Věda a technologie: krok do budoucnosti»* — 2012. — Vol. 29. — P. 34 — 41.

13. Lakhtin M., Lakhtin V., Aleshkin A., Bajrakova A. et al. Lectin systems imitating probiotics: potential for biotechnology and medical microbiology // In: "Probiotics 2012", ed. by E.C. Rigobelo. — 2012. — P. 417 — 432.

Сведения об авторах

Лахтин Владимир Михайлович — доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

Байракова Александра Львовна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

Лахтин Михаил Владимирович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Андрей Владимирович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

Афанасьев Станислав Степанович — заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Владимир Андрианович — заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)