

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Направление «Медицина»

Кафедра физиологии

РОМАНОВ Михаил Игоревич

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

*Проявление адаптационного потенциала *Candida albicans* в смешанных биопленках с лактобактериями на фоне изменения температуры и pH*

Уровень образования: специалитет

Направление «Медицина»

Основная образовательная программа 31.05.01 «Лечебное дело»

Научный руководитель:

к.б.н., доц.

Орлова Ольга Геннадьевна

Рецензент:

д.б.н., проф.

Сесь Татьяна Павловна

Санкт-Петербург

2023 год

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Биоплёнки	7
1.2. Гетерогенность биоплёнок и влияние стрессовых факторов	13
1.3. Способы воздействия на биопленки	16
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	22
2.1. Объекты исследования	22
2.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> 8РА-3	22
2.1.2. <i>Candida albicans</i>	23
2.1.3. <i>Candida tropicalis</i>	31
2.1.4. <i>Candida parapsilosis</i>	31
2.1.5. Молочная кислота.....	32
2.2. Методы исследования	34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	36
3.1. Метод O'Tolle.....	36
3.2. Метод сканирующей электронной микроскопии	50
3.3. Заключение	59
3.4. Выводы.....	61
Список литературы	61
Благодарности	65

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

мБ – мегабаза

КОЕ – колониеобразующая единица

ОТ – обратная транскрипция

СКАТ – стратегия контроля антимикробной терапии

СМ - световая микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УПМ – условно патогенные микроорганизмы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Современные представления об инфекционных заболеваниях человека включают в себя понятие о способности микроорганизмов к сосуществованию в виде биоплёночных сообществ. Формирование биоплёнок ведёт к значительному снижению эффективности терапии, повышает количество осложнений, вероятность хронизации и генерализации инфекционного процесса [1,2]. Доказана существенная роль биоплёнок в появлении госпитальных штаммов и их связь с катетер-ассоциированными, вентилятор-ассоциированными инфекциями. Эта особенность характерна для большого количества микроорганизмов, включая микроскопические грибы [3]. Биопленки могут повышать устойчивость микроорганизмов к ультрафиолетовому излучению, температурному фактору и рН, высокому содержанию солей в среде, высокому давлению, недостатку питательных веществ, антибиотикам и другим неблагоприятным факторам [4]. Именно поэтому исследованию способности микроорганизмов к формированию сообществ посвящено множество работ в области фундаментальных биологических наук и в сфере клинических дисциплин. Одним из наиболее перспективных направлений является анализ межвидовых взаимодействий микроорганизмов, способных к биоплёнкообразованию.

Микроскопические грибы рода *Candida* являются наиболее распространенной причиной развития грибковых инфекций. При проявлении патогенных свойств клетки *Candida spp.* могут изменять свои морфофизиологические параметры и образовывать микробные сообщества в виде биоплёнок. Сформированные биопленки *Candida spp.* снижают эффективность воздействия противогрибковых препаратов и приводят к появлению резистентных штаммов.

В организме человека микроскопические грибы рода *Candida* присутствуют в составе нормальной микрофлоры, преимущественно ротовой

полости и влагалища; при этом в данных областях одними из доминирующих микроорганизмов являются грамположительные бактерии рода *Lactobacillus* [5,6]. Бактерии рода *Lactobacillus* обладают способностью к выделению ряда веществ, в частности, молочной кислоты, которые потенциально могут влиять на другие микроорганизмы, в том числе и на биоплёнки микроскопических грибов.

Настоящее исследование посвящено анализу эффекта, оказываемого супернатантом лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 на клетки и биоплёнки грибов рода *Candida*. На данный момент в научной литературе есть ряд исследований, посвящённых этому вопросу, однако их результаты зачастую противоречивы и не позволяют сделать выводы о влиянии внешних факторов на действие супернатанта лактобактерий. Необходимо учитывать, что инфекционные процессы, в том числе первичный и вторичный кандидоз, зачастую сопровождаются реакциями макроорганизма, проявляющимися в том числе изменением базальной температуры и кислотно-основного равновесия. Эффект, оказываемый лактобактериями на клетки и биоплёнки микроскопических грибов, может изменяться в зависимости от факторов внешней среды.

Цель исследования

Анализ деструктивных изменений в клетках и биоплёнках микроскопических грибов рода *Candida spp.* при воздействии супернатанта лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 на фоне изменения температурного режима и уровня рН среды культивирования.

Задачи исследования

1. Оценить способность микроскопических грибов рода *Candida* к формированию биоплёнок при воздействии супернатанта *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 при разных температурных режимах культивирования.

2. Изучить влияние действия раствора фосфатного буфера и молочной кислоты на клетки грибов рода *Candida* и их биоплёнки.
3. Провести анализ биоплёнкообразования и морфологических изменений в клетках грибов рода *Candida* при сочетанном воздействии супернатанта *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 и раствора фосфатного буфера либо молочной кислоты.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биоплёнки

Биоплёнка – это прикреплённое к плотной поверхности сообщество микроорганизмов, в котором адсорбированные на субстрате и друг к другу клетки заключены в межклеточный матрикс [7].

Первое научное сообщение о биоплёнках, подтверждённое документально, было сделано Антони ван Левенгуком в 1683 году в образце зубного налёта, однако долгое время – до XX века – теории биоплёнкообразования не существовало [8,9]. Лишь в 1978 году Джоном Уильямом Костертоном была предложена теория образования биоплёнок. В дальнейшем, работы, проводимые другими исследователями, подтвердили существование этого явления [10].

В середине 1980-х годов научным сообществом окончательно было принято явление существования биоплёнок. Последующие исследования показали, что биоплёнки являются не просто механизмом защиты микроорганизмов от факторов внешней среды, но естественной формой их существования и одной из стадий их развития. Способность образовывать биоплёнки оказалась характерна для многих микроорганизмов, как патогенных, так и условно-патогенных [11].

Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний Соединённых Штатов Америки, более 70% инфекционных заболеваний человека опосредованы образованием биоплёнок или сопровождаются им [9,11].

Структура биоплёнок

Для биоплёнок характерна особая ультраструктурная организация. Они могут состоять как из одного вида микроорганизмов, так и из нескольких [12]. Электронно-микроскопические исследования биоплёнок различных

микроорганизмов, как однородных, так и смешанных, продемонстрировали, что структура их биоплёнок характеризуется значительным сходством. При этом общие черты отмечали не только у родственных организмов, но и у представителей не только различных семейств и классов, но даже различных царств: например, биоплёнки *Candida albicans* обладают структурой, аналогичной биоплёнкам условно-патогенных бактерий [7].

Большинство биоплёнок отличаются рядом ключевых особенностей, к которым относится образование межклеточного матрикса, способность формировать поверхностную плёнку, необходимую для защиты от неблагоприятных факторов внешней среды, а также активные взаимодействия между составляющими её микроорганизмами. Последнее заслуживает особого внимания, поскольку данные взаимодействия могут быть достаточно сложными, а входящие в состав биоплёнки клетки способны дифференцироваться по признакам и функциям [11].

Поверхностная плёнка представляет собой комплекс защитных структур, но обладает также и объединяющей функцией. Её структура включает в себя трёхслойную мембрану, аналогичную плазматической мембране, универсальной для многих живых организмов, а также полисахаридные слои. Под поверхностной плёнкой располагается пространство, в котором накапливаются продукты автолиза и метаболизма клеток, входящих в состав биоплёнки – клеточный детрит [7].

Матрикс биоплёнки состоит преимущественно из полисахаридов, хотя там могут обнаруживаться и вещества неклеточного происхождения, например, кристаллы минералов, частицы глины, компоненты крови и так далее. На долю внеклеточного матрикса приходится около 50-90% массы биоплёнки. Состав матрикса непостоянен и меняется в зависимости от этапа развития биоплёнки, а также от взаимодействий между клетками и внешних

воздействий: физических и химических, а также температуры окружающей среды и её состава [10].

Формирование биоплёнок

Как основные стадии формирования биоплёнки обычно выделяют первичное прикрепление, окончательное прикрепление, образование микроколоний, созревание и дисперсию. Все организмы, для которых характерно образование биоплёнок, проходят через эти стадии [13].

Планктонные микроорганизмы изначально находятся в окружающей среде в свободном состоянии и движутся к поверхностям под воздействием гравитации и физических сил, а также реагируя на изменение физико-химических свойств среды. Прикрепление к поверхности происходит при помощи неспецифических взаимодействий: сил Лифшица-Ван-дер-Ваальса, кислотно-основных, гидрофобных и электростатических сил. Кроме того, бактерии могут использовать жгутики и пили для временного прикрепления, а также для исследования окружающего пространства [13].

Микроорганизмы используют пили как для неспецифической, так и для специфической связи с поверхностью. Неспецифический механизм заключается в полимеризации пилей и их удлинении, что позволяет связаться с субстратом. При необходимости происходит обратный процесс – деполимеризация, что ведёт к укорочению пилей и потере связи с поверхностью. Было показано, что при помощи пилей бактерии могут поворачиваться во время движения в плоскости, параллельной поверхности, или переходить из горизонтального в вертикальное положение и наоборот [13].

Жгутики активнее всего прикрепляются к гидрофобным поверхностям, поскольку являются гидрофобными структурами. Сообщалось, что они принимают участие как в первичном, так и в окончательном прикреплении.

Ряд бактериальных клеток использует для прикрепления к поверхности множественные латеральные жгутики [13].

Кроме того, бактериальные клетки могут прикрепляться к поверхности специфически при помощи бактериальных адгезинов, в том числе коллагена, фибриногена и фибронектина, а также гликопротеинов и рецепторов гликолипидов [13].

Окончательное прикрепление начинается при помощи механотрансдукции. Механические сигналы вызывают биохимические изменения, что в конце концов приводит к увеличению продукции и экспрессии адгезинов. В эту фазу некоторые бактерии меняют свой фенотип. Часто происходит удлинение клетки и прикрепление при помощи латеральных жгутиков. Бактерии большинства видов, располагаясь в начале прикрепления перпендикулярно поверхности, переходят в горизонтальное положение, тем самым повышая площадь соприкосновения [13].

После того, как микроорганизмы закрепляются на поверхности, начинается рост и деление клеток, которые приводят к образованию микроколонии. Бактерии делятся бинарно либо асимметрично. На этой стадии происходит активация вторичных мессенджеров, факторов межклеточной коммуникации, а также секреция внеклеточного матрикса [13].

Дальнейшая судьба клеток, появляющихся в биоплёнке, различна. Они могут делиться дальше или перейти в планктонное состояние. Свободноплавающие клетки могут прикрепляться к поверхности и образовывать микроколонии, прикрепляться к уже сформировавшимся колониям или же инициировать образование свободноплавающего бактериального агрегата, который впоследствии также может прикрепиться к другой плёнке или неколонизированной поверхности [13].

Первоначально биоплёнка представляет собой только один слой клеток, но по мере роста постепенно становится многослойным образованием. Среди факторов, способствующих образованию и регуляции стереоструктуры, выделяют пили IV типа, поли-N-ацетилглюкозамин, межклеточную коммуникацию. Колонии на этом этапе не всегда прикрепляются необратимо: небольшие скопления способны перемещаться по поверхности и сливаться друг с другом [13,14].

Модели для изучения биоплёнок

Модели, предназначенные для изучения биоплёнок, условно можно разделить на модели *in vitro* и модели *in vivo*.

Модели для изучения биоплёнки *in vitro* подразделяются на закрытые (статические), открытые (динамические) и микрокосмы. Статические модели ограничены исходными ресурсами и условиями либо периодически обновляются, удаляя продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Динамические модели включают в себя непрерывную подачу питательных веществ и удаление отходов. Микрокосмы представляют собой более сложные системы, в которых представлены также клетки и вещества, соответствующие выбранной модели, позволяющие моделировать условия *in situ* [14].

К основным используемым на данный момент методам относят следующие:

Культивирование биоплёнок в жидкости [14]. Культивирование в луночных планшетах, на стеклах, в чашках Петри различного диаметра, силиконовых и белковых субстратах, катетерах, поликарбонате и т.д. Преимущества: простота, дешевизна выполнения, не требуется сложное оборудование, есть возможность оценки фактора изолированно. Недостатки: модели не учитывают аэрации, подачи свежей среды и прочих естественных в природных системах факторов.

Метод изолированной биоплёнки [14]. Культивирование на поверхности пористого поликарбонатного диска, помещённого на чашку с агаризированной питательной средой.

Трёхмерные биопечатные конструкции (сплошные или пористые) [14]. Преимущества: возможность исследователю самостоятельно, возможность выращивания биоплёнки до 28 дней, подходит для аэробных и анаэробных биоплёнок, устойчивость культуры к воздействию антимикробных препаратов. Недостатки: неустойчивость конструкций толщиной менее 0,5 мм, отсутствие взаимодействия с клеточными и молекулярными компонентами.

Предметные стёкла с гидрофильно-гидрофобным узором микрокластеров с заданной геометрией [14]. Преимущества: контроль геометрии, возможность изучать взаимодействие между субпопуляциями, стабильность биоплёнок. Недостатки: размер и расположение микрокластеров могут влиять на образование биоплёнки, возможно взаимодействие между кластерами, отсутствие взаимодействия с клеточными и молекулярными компонентами.

Модель с гранулами альгината натрия [14]. Преимущества: быстрота, воспроизводимость, равномерное воздействие антимикробных препаратов, равномерное образование биоплёнок на всей поверхности гранул. Недостатки: неодинаковые размер и форма альгинатных гранул, влияние свойств гранул на рост биоплёнок, отсутствие взаимодействия с клеточными и молекулярными компонентами.

Методы анализа биоплёнок

Одним из методов является количественное определение красителя, такого как генцианвиолет, связавшегося с бактериальными клетками. Основными недостатками данного метода является непрямая оценка [14].

Для оценки химического состава биоплёнки можно использовать спектроскопию ядерного магнитного резонанса, а также инфракрасную микроскопию с преобразованием Фурье. Данные методы позволяют охарактеризовать динамику воды, биомолекул, провести анализ клеточных и внутриклеточных компонентов [14].

Методы визуализации биоплёнок [14]:

- Флуоресцентная микроскопия
- Сканирующая электронная микроскопия
- Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- Световая микроскопия
- Инфракрасная спектроскопия
- Спектроскопия отражения
- Оптическая флуориметрия

1.2. Гетерогенность биоплёнок и влияние стрессовых факторов

Клетки биопленки подвергаются более высокой скорости мутации, чем их планктонные аналоги, что приводит к 10-кратному увеличению эффективности переноса плазмиды, содержащей ген устойчивости к антибиотикам, когда биопленка подвергается воздействию сублетальной концентрации этого антибиотика [15].

На данный момент было проведено много исследований, посвящённых анализу изменения генома бактериальных клеток в биоплёнках. В них неоднократно отмечали, что у микроорганизмов, входящих в состав биоплёнки, случаи появления генетических изменений наблюдаются гораздо чаще. Во многих работах отмечали различия в экспрессии белков. Необходимо при этом отметить, что в различных исследованиях были

получены разные результаты для экспрессии генов даже для одних и тех же штаммов: так, изменения генома *Escherichia coli* составляли от 4,5% до 38% по данным четырёх разных работ. Это позволяет предположить, что генетические изменения связаны с рядом факторов: питательной средой, штаммом микроорганизма, стадией биоплёнки на момент изучения и прочими [16].

Бактерии могут образовывать биопленки в ответ на стрессовые факторы, такие как УФ-излучение, высыхание, ограниченное количество питательных веществ, экстремальные значения pH, экстремальные температуры, высокие концентрации солей, высокое давление и антимикробные агенты [13].

Показано, что неблагоприятные условия окружающей среды приводят к увеличению уровня ц-ди-ГМФ в бактериальных клетках. Это способствует, в свою очередь, увеличению продукции адгезинов, а также внеклеточного матрикса [1].

Кроме того, сообщалось о том, что в результате воздействия стрессовых факторов увеличивается частота мутаций в бактериальных клетках. Влияние стресса происходит напрямую или же косвенным образом. Прямое воздействие стресса заключается в повреждении бактериальных клеток активными формами кислорода или азота, что приводит к изменениям структуры ДНК, а также белков, поддерживающих целостность ДНК. В результате косвенного воздействия происходит изменение генома клетки и, как следствие, экспрессия специфических генов, участвующих в репарации ДНК, таких как SIRT6. Имеются данные, что при воздействии неблагоприятных факторов увеличивается экспрессия белков, отвечающих за реакцию на стрессовые воздействия, за снижение метаболизма, за развитие внутриклеточных органелл и продукцию внеклеточного матрикса [16].

По данным некоторых источников, отмечали, что экспрессия генов может сильно варьировать даже у соседних бактериальных клеток,

находящихся в биоплёнке. Таким образом, вариативность в данном случае носит стохастический характер, в отличие от непосредственных изменений ДНК, которые распространяются в биоплёнках в соответствии с естественным отбором. Предполагают, что такие стохастические механизмы регуляции экспрессии генов, в противовес геномным изменениям, не связаны с окружающей средой [17].

Есть данные, что экспрессия белков, участвующих в горизонтальном переносе генов путём трансдукции, трансформации или конъюгации, снижена в бактериальных клетках, входящих в состав биоплёнки, по сравнению с планктонными клетками. Аналогичным образом снижена экспрессия белков, которые участвуют в гликолитическом пути [16].

В некоторых работах были обнаружены мутации, которые, по-видимому, последовательно и положительно отбираются, после чего начинали обнаруживаться во всех последующих поколениях биоплёнок [18].

Среди бактерий, у которых зафиксировано изменение генома или уровня экспрессии белков, отмечают: *Escherichia coli*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus uberis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Cronobacter sakazakii*, *Clostridium perfringens*, *Gardnerella vaginalis* [16], *Phaeobacter inhibens* [18], *Bacillus subtilis*, *Pseudoalteromonas species* [17].

В качестве особого неблагоприятного фактора внешней среды, действующего на бактерии, образующие биоплёнки, стоит упомянуть другие микроорганизмы, которые находятся с данным штаммом в конкурирующих взаимоотношениях.

1.3. Способы воздействия на биопленки

Тепловой стресс

В одном из исследований, посвящённых *C. albicans*, проводили изучение воздействия умеренного теплового стресса на биоплёнки *C. albicans*. Было показано, что тепловое воздействие приводило к удлинению времени, в течение которого клетки биоплёнки *C. albicans* пребывали в мицелиальной форме. При температуре 37°C в течение 3 часов был достигнут максимум клеток, перешедших из дрожжевой формы в мицелиальную, однако через 6 часов практически все клетки вновь вернулись в дрожжевую форму. Такое возвращение в форму дрожжевых клеток не было зарегистрировано при температуре 39°C и при умеренном тепловом стрессе. В ходе исследования было проведено электронно-микроскопическое исследование, которое показало, что тепловой стресс приводил к значительному увеличению толщины внутренней клеточной стенки клеток *C. albicans* и уменьшению плотности наружной клеточной стенки в мицелиальных клетках. В результате теплового стресса было зафиксировано повышение экспрессии 11 генов (включая такие гены, как *RHR1*, *GGT13*, *UME7* и другие) и снижение экспрессии 17 генов (включая *CPP1*, *YWP1* и другие). Авторы работы отметили, что изменение экспрессии некоторых генов, например, *RHR1*, могут приводить к изменению чувствительности клеток к антимикотическим препаратам [19].

В другом исследовании проводили изучение влияния теплового стресса до 41°C на восприимчивость биоплёнки *C. albicans* к антимикотическим препаратам. В качестве противогрибковых агентов исследователи выбрали флуконазол, микафунгин и амфотерицин В. В ходе эксперимента клетки подвергали перепаду температур от 37 до 39 °C и до 41 °C. Было обнаружено, что флуконазол и микафунгин в концентрациях от 0,0625 до 2 мкг/мл, а также амфотерицин В концентрациях от 0,0625 до 1 мкг/мл отмечали ингибирование жизнедеятельности клеток, однако число клеток, для которых

оно было зарегистрировано, не превышало 20% по сравнению с 37 °С. При повышении температуры до 39 °С и 41 °С применение флуконазола в концентрациях от 0,5 до 2 мкг/мл, микафунгина в концентрациях от 0,25 до 2 мкг/л и амфотерицина В в концентрации 1 мкг/л приводило к статистически значимому увеличению ингибирующего эффекта ($p < 0,05$). Авторы работы, основываясь на полученных данных, пришли к заключению, что тепловой стресс приводит к повышению восприимчивости *C. albicans* к антимикотическим агентам, используемых в рамках данной работы. Они высказывают предположение, что это может быть связано с увеличением мицелиальной составляющей биоплёнки, что наблюдали посредством микроскопии [20].

Уровень кислотности

В одном из исследований клетки *C. albicans* подвергали обработке молочной, уксусной, пропионовой и масляной кислотами. Предметом исследования было изменение активности транскрипции на основании данных транскриптома под воздействием органических кислот, которые могут встречаться в естественном окружении *C. albicans* как, преимущественно, продукты бактериальной анаэробной ферментации. Авторами работы было показано, что воздействие каждой из исследуемых кислот приводило к появлению уникальных профилей экспрессии генов, существенно отличающихся при кратковременном и длительном (до 3 суток) воздействии. Вместе с тем было отмечено сходство реакций на стресс в виде органических кислот, проявляющееся в снижении концентрации внутриклеточного железа, ингибировании синтеза РНК и биогенеза рибосом [21].

В одной из работ, посвящённых влиянию уровня рН на рост и биоплёнкообразование *C. albicans*, выращивание производили при температуре 37°C в течение 24 часов при рН 4 и 7. Были проанализированы такие показатели, как количество КОЕ, толщина биоплёнок,

морфологические особенности клеток, а также ряд других. Обнаружено, что при рН 4 биоплёнки отличались меньшей биомассой, меньшим количеством КОЕ и меньшей толщиной по сравнению с биоплёнками, полученными при рН 7. Кроме того, было выявлено, что для *C. albicans* характерно более активное образование псевдомицелия при рН 4 по сравнению с рН 7, а длина филаментов псевдомицелия была в среднем больше. Необходимо заметить, что данные результаты относятся исключительно к *C. albicans* и не могут быть экстраполированы на другие виды рода *Candida*: авторы работы отмечают, что реакции других видов могут существенно отличаться [22].

В другом исследовании показано, что уровень рН оказывает большое влияние на форму колоний *C. albicans*, а также парасексуальные процессы. Так, обнаружили, что низкий рН приводил к переходу белых колоний в серые непрозрачные, то есть в другой характерный для *C. albicans* морфологический тип колоний. Отмечали подавление парасексуального цикла под действием высокой кислотности, что авторы связывали с неспособностью Ste2-опосредованного ответа на α -феромон [23].

В ряде работ описывали регуляцию перехода *C. albicans* из дрожжевой формы в мицелиальную. При рН окружающей среды, стремящемся к щелочному, стимулируется образование мицелия, в то время как увеличение кислотности приводит к ингибированию перехода и увеличению количества, таким образом, клеток, находящихся в дрожжевых формах. Кислотность среды воздействует на гены Phr1 и Phr2, кодирующие две гликозидазы, являющиеся первым звеном в регуляции образования мицелия и псевдомицелия посредством рН, при этом дефект PHR1 ведёт к нарушению роста и образованию мицелия при нейтральном и щелочном рН, дефект PHR2 – при кислом [24].

Взаимодействия микроскопических грибов рода *Candida* и лактобактерий рода *Lactobacillus*

Parolin и др. [25] проводили исследование антикандидозной активности вагинальных штаммов лактобактерий и влияния на неё биоплёнкообразования. В качестве объекта изучения были выбраны 16 штаммов, принадлежащих видам *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus vaginalis* и *Lactobacillus plantarum*. Наиболее активно образование биоплёнок наблюдали у *Lactobacillus plantarum*. Из данных микроорганизмов, как в форме биоплёнок, так и в планктонной форме, получали супернатант, который использовали для обработки клинических изолятов *Candida*, а именно *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* и *Candida parapsilosis*. Было обнаружено, что наибольший фунгистатический эффект заметен у штаммов *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus plantarum*. Кроме того, образование биоплёнок, по данным исследователей, усиливало этот эффект [25]. Таким образом, показано, что антикандидозная активность может достаточно сильно варьировать между различными видами *Lactobacillus*. Это подтверждают и более ранние работы, позволяя утверждать при этом о различиях не только между видами, но и между штаммами [26].

В исследовании, проведённом Vazquez-Munoz и др. [27], также изучали вопрос взаимодействия между клетками *Candida albicans* и лактобактериями рода *Lactobacillus*. Эксперименты проводили на штамме *Lactobacillus johnsonii* МТ4. Исследователи, обращая внимание на способность лактобактерий продуцировать бактериоцины, органические кислоты (в первую очередь молочную и уксусную) и биосурфактанты, обладающие антикандидальными свойствами, произвели анализ антагонистических взаимодействий между ними и *C. albicans*. При этом учитывали ряд факторов, например, изменение рН и доступность питательных веществ. В ходе эксперимента проводили совместное культивирование обоих микроорганизмов в жидких питательных средах, а также анализ влияния инактивированных ультрафиолетовым излучением

клеток *L. johnsonii* или супернатанта *L. johnsonii* на живые клетки *C. albicans*. В качестве параметров, на основе которых была сделана оценка биоплёнок *C. albicans*, были выбраны следующие: объём и толщина, биомасса и метаболическая активность. Результаты исследования показали, что *L. johnsonii* в рамках данных экспериментов действительно обладал антикандидозной активностью, как рН-зависимой, так и рН-независимой, опосредованной высвобождением метаболитов лактобактерий. Действие метаболитов приводило к ингибированию как планктонного роста, так и образования биоплёнки *C. albicans*. Отдельный опыт, в котором клетки *C. albicans* обрабатывали исключительно молочной кислотой, также демонстрировали ингибирование роста, но, в среднем, меньшее по сравнению с обработкой метаболитами *L. johnsonii* или совместным культивированием. Одним из факторов, влияющих на антикандидозную активность лактобактерий, была также доступность углеводов в среде: безуглеводное окружение приводило к снижению активности *L. johnsonii*, включая антагонистическое антикандидозное действие. Основываясь на полученных данных, авторы работы сделали вывод, что *L. johnsonii* оказывает антагонистическое действие на *C. albicans* путём продукции метаболитов, причём ряд факторов внешней среды, например, доступность углеводов в окружении, может существенно повлиять на него [27].

Таким образом, стоит учитывать, что при взаимодействии двух сообществ микроорганизмов друг с другом каждое из них может быть чрезвычайно зависимо не только от присутствия другого микроорганизма, но и от факторов окружения, оказывающих непосредственное влияние на их собственный метаболизм.

Ещё в одной работе были сделаны опыты по взаимодействию *Lactobacillus plantarum* 108 и смешанной биоплёнки из *Candida albicans* и *Streptococcus mutans* [28]. В ходе эксперимента образцы биоплёнки подвергали обработке супернатантом *Lactobacillus plantarum*. Показано, что

присутствие супернатанта лактобактерий приводило не только к ингибированию формирования новых биоплёнок, но и к уменьшению уже сформированных. Было зарегистрировано снижение экспрессии генов HWP1, ALS1 и ALS3, специфичных для *C. albicans*. Исходя из полученных данных, авторы работы пришли к заключению, что супернатант *Lactobacillus plantarum* оказывал ингибирующее действие на биоплёнки, состоящие в том числе из *C. albicans*, и было доказано, что он действует в том числе и на её клетки, о чём свидетельствуют изменения экспрессии специфичных генов [28].

Аналогичная работа, выполненная Krzyściak и др. [29], также включала в себя исследование взаимодействия лактобактерий со смешанной биоплёнкой *Candida albicans* и *Streptococcus mutans*. В данных экспериментах, однако, использовали вид *Lactobacillus salivarius*. Опыты проводились *in vitro*. Оценивали такие параметры, как масса биоплёнки, количество колониеобразующих единиц на миллилитр и морфология клеток при электронной микроскопии. Исследователи установили, что в рамках данного исследования пробиотик *Lactobacillus salivarius* приводил к снижению массы и количества колониеобразующих единиц в биоплёнке, ингибировал образование мицелия *C. albicans*, и пришли к заключению, что *Lactobacillus salivarius* способен, вероятно, снижать патогенный потенциал *C. albicans* путём ингибирования морфологической трансформации [29].

Разнообразные стрессовые факторы

Ряд исследований был посвящён изучению влияния самых различных стрессовых факторов на *C. albicans*. Так, в одном из них проводили анализ действия, оказываемого флуконазолом на *C. albicans*, а также роль меди в изменении транскрипции. Согласно полученным данным, даже небольшие изменения в доступности Cu оказывали существенное влияние на транскрипцию *C. albicans*: из 2359 генов, экспрессия которых менялась в ходе опыта, около 50% демонстрировали уникальную реакцию в случае

одновременного присутствия флуконазола и недостатка меди. Таким образом, на экспрессию генов могут в достаточной степени повлиять даже такие факторы, как содержание меди в окружающей среде. Это стоит учитывать как при проведении опытов – состав окружающей среды должен быть одинаков во всех исследуемых группах – так и, согласно авторам работы, при разработке методов борьбы с *C. albicans* [30].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В данной работе использованы следующие штаммы микроорганизмов: *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 (Флорин® форте Партнер, Россия), *Candida albicans*, *Candida tropicalis* и *Candida parapsilosis* (музей культур ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ).

2.1.1. *Lactobacillus plantarum* 8РА-3

По современной классификации бактерии вида *Lactobacillus plantarum* относятся к роду *Lactobacillus*, семейство *Lactobacillaceae*, порядок *Lactobacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*, царство Бактерии [31].

Lactobacillus plantarum – вид каталаза-негативных бактерий, занимающий разнообразные экологические ниши, включая различные отделы желудочно-кишечного тракта человека. Кроме того, они составляют часть нормальной микрофлоры, населяющей влагалище, в том числе выделяются в вагинальном содержимом в пременопаузе. Клетки *L. plantarum* представляют собой грамположительные неспорообразующие неподвижные прямые палочки с закруглёнными концами, размерами 0,5–1,2 мкм в ширину и 1,0–10,0 мкм в длину, хотя морфология их может быть в достаточной степени вариативной. В планктонной форме для *L. plantarum* характерны

одинокими клетками, парными клетками или короткими цепочками. Размер генома *L. plantarum* составляет 3,3 Мб, и такую величину исследователи связывают с разнообразием занимаемых ниш. *L. plantarum*, согласно ряду данных, является одним из видов лактобактерий, обладающих наиболее выраженной антимикробной активностью по отношению к другим видам [7,32].

Среди свойств *L. plantarum* стоит упомянуть способность образовывать ряд веществ, которые могут подавлять рост других микроорганизмов. К ним относятся молочная кислота, перекись водорода, лизоцим и прочие, представленные различными типами бактериоцинов молекулярной массой от 10^3 до 10^6 килодальтон. Описаны антагонистические отношения между *L. plantarum* и факультативной микробиотой [7].

L. plantarum также может образовывать биоплёнки, в том числе и на стеклянной поверхности, при этом в достаточной степени склонны к автоагрегации. В форме биоплёнок лактобактерии демонстрировали большую устойчивость к неблагоприятным воздействиям внешней среды, по сравнению с планктонной формой: отмечалось изменение профиля устойчивости при воздействии органических кислот, этанола и других факторов [33]. Кроме того, в некоторых исследованиях отмечено увеличение ингибирования патогенных организмов в форме биоплёнки: супернатант *L. plantarum* оказывал более выраженное подавляющее действие на некоторые микроорганизмы и выработку фактора некроза опухоли- α , а также активировал моноцитоподобные клетки человека, но исключительно при использовании супернатанта биоплёнки, для супернатанта планктонной формы отмечалась более низкая эффективность [34].

2.1.2. *Candida albicans*

Род *Candida* является одним из наиболее характерных, многочисленных и гетерогенных условно-патогенных микроорганизмов, составляющих часть

нормальной микробиоты человека. Типовым видом, принадлежащим к этому роду, является вид *Candida albicans*.

Для *Candida albicans* характерно, в отличие от других представителей рода *Candida*, образование хламидоспор, необходимых для сохранения в период покоя жизнеспособности клеток. Колонии *Candida albicans*, образующиеся на плотных субстратах, визуально во многом схожи с бактериальными колониями. Для них характерна гладкая поверхность, ровный край, густая консистенция и цвет преимущественно белых оттенков [7].

Изучение *Candida albicans*, особенностей данного микроорганизма и его жизнедеятельности является весьма актуальной задачей, поскольку вторичный кандидоз свидетельствует о неблагоприятном патогенетическом фоне, а именно наличии иммунодефицитного состояния, последствий массивной нерациональной антибиотикотерапии, дисбактериоза. Это связано с тем, что при подавлении соседствующей с *Candida* нормальной микробиоты, оказывающей антагонистические воздействия против условно-патогенных микроорганизмов, начинается активное развитие *Candida albicans* и, как следствие, кандидоз [7].

Таким образом, важным является не только исследование свойств *Candida albicans* как самостоятельного организма, но и анализ взаимодействия с другими представителями микробиоты. Кроме того, изменение свойств и активности *Candida albicans* могут служить ранним маркером возникновения ряда патологических состояний, в первую очередь, иммунодефицита.

Клетки *C. albicans* составляют 4–6 мкм в ширину и 6–10 мкм в длину [35].

Геном *C. albicans*

Основными штаммами, использующимися для считывания генома *Candida albicans*, являются штаммы SC5314 и CBS5736 [36]. Большинство изолятов *Candida albicans* имеют диплоидный генетический набор. На данный момент известно 6043 кодирующих белки гена и 119 РНК-генов. Генетическая последовательность разделена на 412 суперконтигов, из которых 146 суперконтигов составляют гомологичные пары, 119 получены при помощи Phrap и не могут использоваться для связи с другими суперконтигами, и 1 был составлен из двух Phrap-суперконтигов на основе последовательности GenBank. Эталонный геномный набор состоит из 266 суперконтигов и содержит 7677 открытые рамки считывания из 100 и более аминокислот, в том числе неполные открытые рамки считывания на концах суперконтигов. Согласно данным, полученным Джонсом и др., рибосомальная ДНК включает в себя 12 756 пар оснований [36]. Среди особенностей генома *C. albicans* можно отметить небольшое количество генов, содержащих интроны, а также наличие кодона CUG, который кодирует серин, а не лейцин, как обычно, причём примерно две трети открытых рамок считывания используют этот кодон [36].

Долгое время считали, что для *C. albicans* характерно исключительно бесполое размножение, однако впоследствии в лабораторных условиях был обнаружен парасексуальный цикл, позволяющий достаточно эффективно образовывать рекомбинанты [37].

Для *C. albicans* характерно образование внеклеточных везикул. В одном из исследований *in vitro*, где изучали биоплёнки *C. albicans*, показано, что после обработки культуры *C. albicans* внеклеточными везикулами *C. albicans* обнаруживали ингибирование перехода клеток из дрожжевой формы в форму мицелия. Обработка *C. albicans* внеклеточными везикулами в течение 24 часов приводила к существенному снижению способности клеток проникать в агар. Таким образом, внеклеточные везикулы *C. albicans* играют значительную роль в регуляции процесса биоплёнкообразования и

вирулентности микроорганизма, оказывая на них ингибирующее действие, хотя этим их роль не ограничивается: внутриклеточные везикулы способны стимулировать рост клеток и передавать факторы вирулентности, в том числе невирулентным штаммам [30].

Механизмы мутагенеза *C. albicans*

Точечные мутации. Точечные мутации вносят существенный вклад в изменение генома *C. albicans* в связи с высокой частотой их возникновения. Согласно имеющимся оценкам, на пару оснований приходится $1,2 \times 10^{-10}$ замещений пар оснований. Наблюдения показывают, что *in vivo* частота мутаций выше по сравнению с частотой *in vitro*. Тем не менее мутации у *C. albicans* возникают в популяции реже, чем у большинства эукариот, что связывают с большим количеством (около 36%) геномного материала, содержащего открытые рамки считывания. Следовательно, точечные мутации вероятнее всего вызовут нарушения в синтезе белка, и мутировавший организм попадёт под действие очищающего отбора. Поэтому накопление мутаций происходит преимущественно в межгенных и повторяющихся областях генома, в частности, генах ALS, содержащих повторяющиеся области. В зависимости от внешних условий естественный отбор может способствовать распространению тех или иных точечных мутаций, при этом увеличение приспособленности *C. albicans* к существованию в организме хозяина может вести к снижению патогенности. Примером этому служат мутации FLO8 и EFG1 с повышенной или пониженной активностью данных генов, позволяющей регулировать патогенность и приспособленность [37].

Утрата гетерозиготности *C. albicans*. Даже по сравнению с другими видами *Candida* у *C. albicans* наблюдается большое количество гетерозиготных генов, существенно отличающееся, однако, у различных

изолятов. В результате утраты гетерозиготности и образования, таким образом, гомозиготных форм увеличивается генетическое разнообразие, однако выживаемость и приспособленность таких форм, как правило, достаточно низка. Утрата гетерозиготности может охватывать довольно большие участки хромосом или даже целые хромосомы. Как правило, механизм изменений в таких случаях связан с митотическим кроссинговером или индуцированной разрывом репликации. Частота возникновения больших гомозиготных областей увеличивается от центромер к теломерам. В свою очередь, образование гомозиготных областей (менее 5 килобаз) связано с конверсией генов или двойными кроссинговерами и происходит приблизительно с той же частотой, как и замены оснований *de novo*. Утрата гетерозиготности служит важным механизмом адаптации *C. albicans* к условиям окружающей среды и может использоваться для увеличения приспособляемости. Примером этому служат некоторые клинические изоляты, гетерозиготные по EFG1, но способные в результате утраты гетерозиготности приобретать преимущество для адаптации в условиях желудочно-кишечного тракта [37].

Показано, что частота событий утраты гетерогенности повышается при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды, включая оксидативный стресс, высокую температуру и антимикотические препараты. В одном из исследований тепловой стресс приводил к увеличению частоты от 1 до 40 раз, что не было сочтено статистически значимым изменением, оксидативный стресс – в 3-72 раза, а применение флуконазола – в 285 раз, что было статистически значимо. При этом генетические изменения проявлялись даже при интенсивности воздействия, которая не приводила к ингибированию роста клеток. Кроме того, обнаружено, что различные внешние воздействия приводят к активации различных механизмов изменения генома: так, воздействие пероксида водорода чаще приводило к утрате гетерогенности областями разной протяжённости, связанной с

индуцированной разрывом репликации. Высокая температура приводила к потере хромосом, а флуконазол – как к потере хромосом, так и к утрате гетерогенности большими областями [38].

Изменение плоидности *C. albicans*. В основном для *C. albicans* характерен диплоидный набор хромосом, однако в литературных источниках описаны случаи клеток и с другими наборами, от гаплоидных до тетраплоидных. Увеличение плоидности происходит при конъюгации клеток после утраты гетерозиготности a/α в локусе MTL, при этом клетки a и α становятся способны к взаимному спариванию. На данный момент не было зарегистрировано случаев потери плоидности в результате мейоза, но зарегистрированы механизмы парасексуального цикла, приводящие к потере хромосом до диплоидного набора. При этом происходит образование анеуплоидных форм, что приводит к большой фенотипической гетерогенности. Применение антимикотических лекарственных средств может также приводить к изменению плоидности, что связано в том числе с нарушением расхождения хромосом. В таких случаях могут появляться клетки с плоидностью до $16N$. Другие внешние факторы, например, препараты группы азолов, могут приводить к образованию анеуплоидных форм, что в ряде случаев повышает выживаемость *C. albicans* [37].

Рекомбинация *C. albicans*. Клетки *C. albicans* способны к обмену генетической информацией: в исследованиях обнаруживались смешанные геномы, как ядерные, так и митохондриальные. Как правило, обмен такого рода происходит в ходе парасексуального цикла [37].

Биоплёнки *C. albicans*

Клетки *C. albicans* образуют биоплёнки, состоящие из дрожжевых клеток, псевдомицелия и мицелия. При переходе от планктонного состояния к состоянию биоплёнки наблюдается изменение фенотипа, что ведёт к изменению фенотипа и экспрессии генов [39].

Адгезия клеток C. albicans

При контакте с подходящей поверхностью происходит прорастание клеток *Candida albicans* с образованием мицелия и псевдомицелия. Этап адгезии критически важен для образования биоплёнок данного вида.

Als. Решающую роль в адгезии играют протеины семейства Als [40]. В первую очередь к ним относятся Als1p и Als3p. При неспособности экспрессировать ALS3 *in vitro* образуются менее организованные биоплёнки. Неспособность экспрессировать ALS1 и ALS3 приводит к формированию биоплёнок с меньшей бактериальной массой по сравнению с контрольными биоплёнками. Другие протеины Als также несут значительный вклад. Повышенная экспрессия ALS6, ALS7 и ALS9 компенсирует дефект при мутации *als3ΔΔ/als1*. В то же время мутации в Als5p предотвращают адгезию и развитие биопленки на полистирольных поверхностях *in vitro*. Снижение экспрессии ALS2, но не ALS4, приводило к нарушению образования биопленки. Однако сверхэкспрессия ALS2 или ALS4 не может спасти образование биопленки в *als3ΔΔ/als1ΔΔ* нулевом мутанте *in vivo*. Это говорит о том, что только определенные белки Als могут функционировать эквивалентно Als1p и Als3p в модели формирования биопленки *in vivo* [39].

Hwp. Hwp1p является наиболее тщательно изученным белком из семейства Hwp. Мимикрируя под субстрат трансглутаминазы млекопитающих, он использует её, связываясь с поверхностью клетки-хозяина. Было показано, что клетки *C. albicans* с мутацией по Hwp неспособны ни продуцировать мицелий, ни образовывать, как следствие, биоплёнки. Другие белки из семейства Hwp, включая Hwp2p и Rbt1p, способствуют первоначальному прикреплению клеток и поддержанию адгезии. Дефективные по HWP2 клетки характеризуются сниженной эффективностью адгезии и меньшей массой биоплёнок. Клетки с

повышенной экспрессией RPT1 демонстрируют увеличение гидрофобности поверхности, что способствует связыванию *C. albicans* с полистиролом [39].

Iff/Hyr. По-видимому, единственным членом этого семейства, связанным с развитием биоплёнок, является Hyr1p. Мутанты, дефектные в HYR1, демонстрируют снижение адгезии на начальных этапах развития биопленки, а также уменьшение биомассы из-за дефектного прикрепления. Кроме того, после потери HYR1 наблюдали проблемы как с первоначальным присоединением, так и с последующей адгезией, в то время как потеря ALS3/ALS1 влияла только на поддержание адгезии. На основании этих данных предполагают, что Hyr1p является ключевым в обеспечении адгезии как на ранних, так и на поздних стадиях развития биопленки [39].

Образование, созревание и поддержание структуры биоплёнок

При формировании биоплёнок путём изменения ряда транскрипционных регуляторов изменяется экспрессия примерно 1000 разнообразных генов. Мутантные штаммы *C. albicans*, неспособные экспрессировать BCR1, TEC1, EFG1, NDT8 или ROB1, не образуют биопленок *in vivo*, в то время как абляция BRG1 приводит к образованию биоплёнок с аномальной структурой [39].

Дисперсия

Среди регуляторов дисперсии биоплёнок выделяют белки Nrg1p, Pes1p и Umeбр. Повышенная экспрессия NRG1 ведёт к отрицательному влиянию на преобразование морфологической формы клеток из дрожжевой в мицелиальную. Таким образом, в биоплёнке увеличивается количество дрожжевых клеток, что ведёт к усилению дисперсии. Аналогичным действием обладает и Pes1p: при его сверхэкспрессии дисперсия увеличивается. Umeбр, напротив, приводит к снижению дисперсии [39].

Ywp1p является гликопротеином, ковалентно связанным с бета-глюканами клеточной стенки. Согласно имеющейся на данный момент информации, этот белок обладает антиадгезивными свойствами, что играет важную роль в механизме распространения клеток *C. albicans*. Было обнаружено, что мутанты *C. albicans* с нарушением синтеза и экспрессии Ywp1p демонстрировали усиление адгезии и биоплёнкообразования, но вместе с тем и снижение дисперсии [39].

2.1.3. *Candida tropicalis*

Размер дрожжевых клеток *Candida tropicalis* составляет от 4 до 8 мкм в ширину и от 5 до 11 мкм в длину [35].

C.tropicalis обладает способностью ферментировать сахарозу и мальтозу [41].

Согласно некоторым исследованиям, микозы, связанные с *C.tropicalis*, проявляются большей вирулентностью и устойчивостью микроорганизмов по сравнению с *C. albicans*, а также более высокой смертностью и более продолжительным временем нахождения пациентов в отделении интенсивной терапии [35].

2.1.4. *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis впервые был выделен в отдельный вид от *Candida albicans* в связи с неспособностью к ферментированию мальтозы.

Клетки имеют овальную, цилиндрическую или круглую форму [42]. Размер дрожжевых клеток *C. parapsilosis* составляет от 2,5 до 4 мкм в ширину и от 2,5 до 9 мкм в длину. Для *C. parapsilosis*, в отличие от *C. albicans* и *C.tropicalis*, нехарактерно образование мицелия, но этот вид также может образовывать псевдомицелий [35,43]. На агаре Сабуро с декстрозой *C.*

parapsilosis образуют белые, кремовые, блестящие, гладкие или морщинистые колонии [42].

C. parapsilosis является комменсалом кожи человека, и его патогенность, как правило, не проявляется при неповреждённом кожном покрове. В отличие от *C. albicans* и *C. tropicalis*, данный вид может быть выделен не только от человека, но и от животных, из почвы и из морской среды. Чаще всего кандидоз, связанный с *C. parapsilosis*, наблюдают у новорождённых, особенно с низкой массой тела, у людей с иммунодефицитом, а также пациентов после трансплантации, на парентеральном питании и с центральными венозными катетерами, установленными в течение продолжительного периода. Возможен вертикальный путь заражения: от матери к ребёнку [42].

C. parapsilosis, по сравнению с *C. albicans*, образует биоплёнки менее интенсивно, а их структура отличается меньшей сложностью.

2.1.5. Молочная кислота

Молочная кислота представляет собой бесцветную или жёлтую жидкость без запаха или с очень слабым едким запахом. Используется для производства кисломолочных продуктов, а также в качестве консерванта для пищевых продуктов и в производстве химических веществ. Растворяется в воде, этаноле, диэтиловом эфире и других органических растворителях, смешивающихся с водой. Практически нерастворима в бензоле и хлороформе. рН 10% водного раствора молочной кислоты составляет 1,75. Молочная кислота применяется в медицине как каустическое вещество, антисептик и антифермент. Основные методы производства молочной кислоты – ферментация простых сахаров и синтез, включающий в себя реакцию ацетальдегида с циановодородом и последующий гидролиз образовавшегося лактонитрила [44].

Молочная кислота является продуктом брожения молочнокислых бактерий. В широком смысле эта группа включает в себя всех бактерий, производящих молочную кислоту в качестве метаболита, и является чрезвычайно разнородной, существуя в различных нишах. Традиционно к ней относят в том числе представителей отряда *Lactobacillales*, в том числе *Lactobacillus plantarum* [45].

Микроскопические грибы рода *Candida* по-разному реагируют на присутствие молочной кислоты в окружающей среде в больших концентрациях. Данные реакции описаны, в частности, в работе Zangl и др [46]. В её ходе штаммы грибов рода *Candida* инкубировали при 37°C в течение 65 часов с добавлением 80% раствора молочной кислоты для достижения концентраций 160 мМ, 320 мМ, 480 мМ, 640 мМ и 800 мМ, доводя рН до 4. Было показано, что ни один из тестируемых штаммов не обнаруживал замедления роста при достижении концентраций молочной кислоты, близких к физиологическим концентрациям, наблюдаемых во влагалище. При повышении концентрации кислоты у *C. albicans* было зафиксировано снижение скорости роста с прямой зависимостью от дозы молочной кислоты. Изоляты *C.tropicalis* продемонстрировали значительное снижение (около 40%) средней скорости роста при 160 концентрации молочной кислоты мМ по сравнению с контрольным образцом с 0 мМ, хотя существенных изменений между 160 мМ и 480 мМ молочной кислоты не было. *C. parapsilosis* отличалась высокой вариабельностью реакции на присутствие высоких концентраций молочной кислоты, причём демонстрирует наибольшую устойчивость по сравнению с *C. albicans* и *C.tropicalis*. Необходимо отметить, что все исследуемые штаммы образовывали кластеры, за исключением *C. albicans*. Авторы работы пришли к заключению, что молочная кислота в концентрации, достигаемой при нормальном метаболизме *L. plantarum*, не приводит к существенному замедлению роста *C. albicans* [46].

2.2. Методы исследования

Метод O'Tolle

Для определения особенностей формирования биопленок *Candida spp.* в присутствии живых клеток лактобактерий и их супернатантов их вводили в Мюллер-Хинтон бульон. Исследование производили в стерильных чашках Петри диаметром 40 мм из полистерола (данный материал улучшает адгезивные способности микроорганизмов). В жидкую питательную среду вводили по 0,1 мл суспензии *Candida spp.* с плотностью 0,5 по МакФарланду (МУК 4.2.1890-04) [47]. Образцы культивировали в термостате в течение 24 и 48 часов при температуре 30, 37 и 39°C.

Интенсивность биопленкообразования рассчитывали по методу O'Toole [48]. Для этого образцы окрашивали генцианвиолетом или фуксином и готовые препараты просматривали в световом микроскопе Микмед 6 (АО ЛОМО, СПб, Россия) со встроенной камерой. Изображения, полученные в световом микроскопе, фиксировали на электронном носителе и обрабатывали при помощи программы ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018).

Выявление особенностей строения бактериальных биопленок методом сканирующей электронной микроскопии

Препараты бактериальных культур для исследования методом СЭМ готовили по специальной методике [7]. Образцы, содержащие сформированную на агаровой подложке бактериальную биопленку, вырезали, формируя блоки размером 0,5 на 1,0 см и помещали на фильтровальную бумагу. Под каждый образец вносили фиксатор 2,5% раствор глутаральдегида в количестве 0,5 мл и высушивали в закрытой чашке Петри при комнатной температуре. После высыхания образцы приклеивали к специальным столикам для сканирующей электронной микроскопии при помощи двухстороннего электропроводящего углеродного

скотча и электропроводящего клея на основе серебра. Затем образцы помещали в вакуумную напылительную установку Leica EM SCD 500, в которой проводили напыление на образцы тонкого слоя золота и платины толщиной 0,15 нм. Морфометрические исследования подготовленных образцов бактериальных биопленок производили на сканирующем электронном микроскопе MIRA-3 (TESCAN, Чехия) при ускоряющем напряжении 9 кВ. Исследования проводили в ресурсном центре СПбГУ.

Методом СЭМ исследовали:

Образцы биопленок *Candida spp.*, сформированные на плотной питательной среде Мюллер-Хинтон при температуре 30, 37 и 39°C;

Образцы смешанных биопленок *Candida spp.* и *L. plantarum* 8PA-3, сформированные на плотной питательной среде Мюллер-Хинтон при температуре 30, 37 и 39°C

Статистическая обработка данных

Обработку данных проводили в программе RStudio (RStudio Team (2021). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>). Для экспериментальных данных рассчитывали t-критерий Стьюдента. Для визуальной оценки полученных данных проводили построение графиков при помощи платформы Jupyter Notebook на языке Python.

Отработка предварительных этапов наземных экспериментов для научных исследований по проекту «Биопленка» на борту МКС

Оценка влияния активных метаболитов пробиотических культур *L.plantarum* 8-RA 3 на формирование биопленок мицелиальных грибов рода *Candida*.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Метод O'Tolle

Исследование особенностей роста культур микроскопических грибов рода *Candida* производили при помощи анализа данных световой микроскопии. С этой целью площадь, занимаемая клетками грибов, подсчитывалась при помощи программ ImageJ и GIMP.

Формирование биопленок микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 37°C

В ходе данного опыта культуры микроскопических грибов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* высевали в 6 стерильных чашек Петри диаметром 40 мм из полистерола с подготовленной средой, таким образом, чтобы на каждый из исследуемых штаммов приходилась чашка Петри с контрольной средой (10 мл бульона Мюллер-Хинтон) и чашка Петри со средой, содержащей супернатант (5 мл бульона Мюллер-Хинтон и 5 мл супернатанта). Вводили по 0,1 мл суспензии *Candida spp.* с плотностью 0,5 по МакФарланду (МУК 4.2.1890-04). Образцы культивировали в термостате в течение 48 часов при температуре 37°C. Оптические фотографии, сделанные при помощи световой микроскопии, представлены на рис. 1–3.

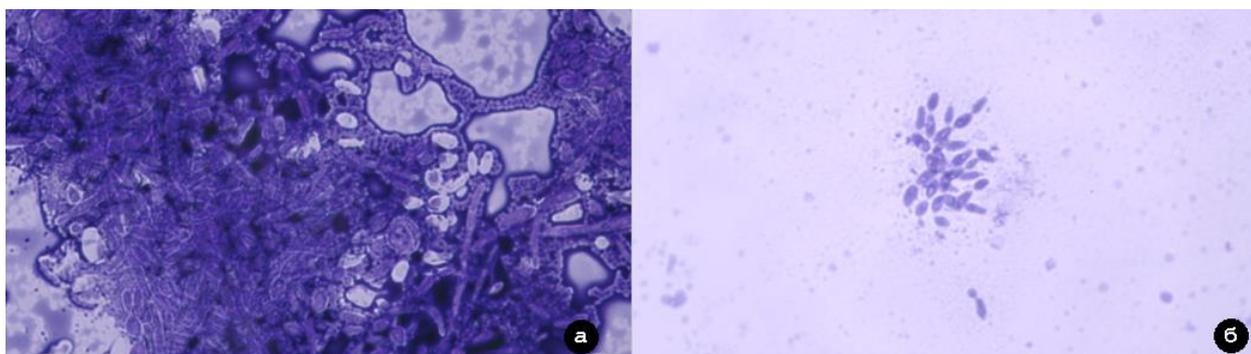


Рисунок 1. СМ. Клетки *C. albicans*, на контрольной среде (а), на среде с супернатантом лактобактерий (б). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000.

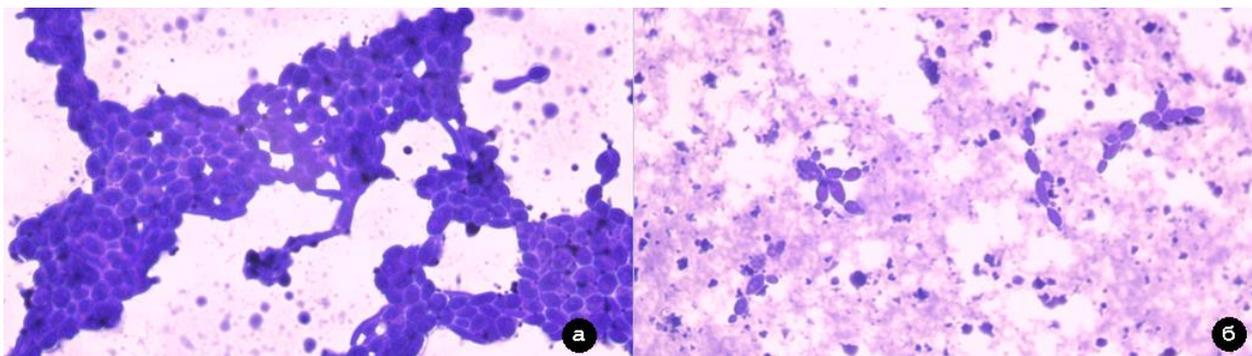


Рисунок 2. СМ. Клетки *C. tropicalis*, на контрольной среде (а), на среде с супернатантом лактобактерий (б). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

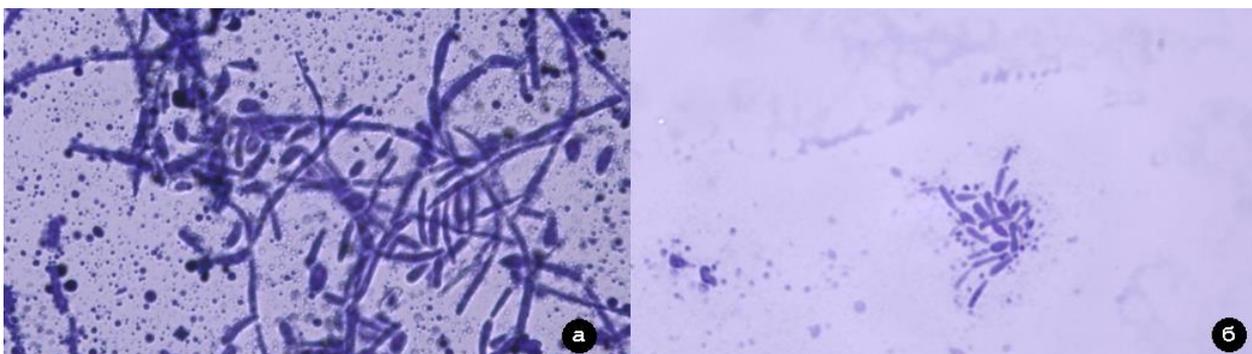


Рисунок 3 - СМ. Клетки *C. parapsilosis*, на контрольной среде (а), на среде с супернатантом лактобактерий (б). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

Расчет биопленкообразования культур проводили по следующей формуле:

$$(БПо/БПк) \times 100\%,$$

где БПо – биопленкообразование в опытных образцах,

БПк – биопленкообразование в контрольных образцах.

Candida albicans: уровень биоплёнкообразования в опытных образцах составил 4,7% от контрольного ($p < 0,05$).

Candida tropicalis: уровень биоплёнкообразования в опытных образцах составил 6,1% от контрольного ($p < 0,05$).

Candida parapsilosis: уровень биоплёнкообразования в опытных образцах составил 76,5% от контрольного ($p=0,15$).

Для визуализации полученных результатов построена следующая диаграмма размаха (рис. 4):

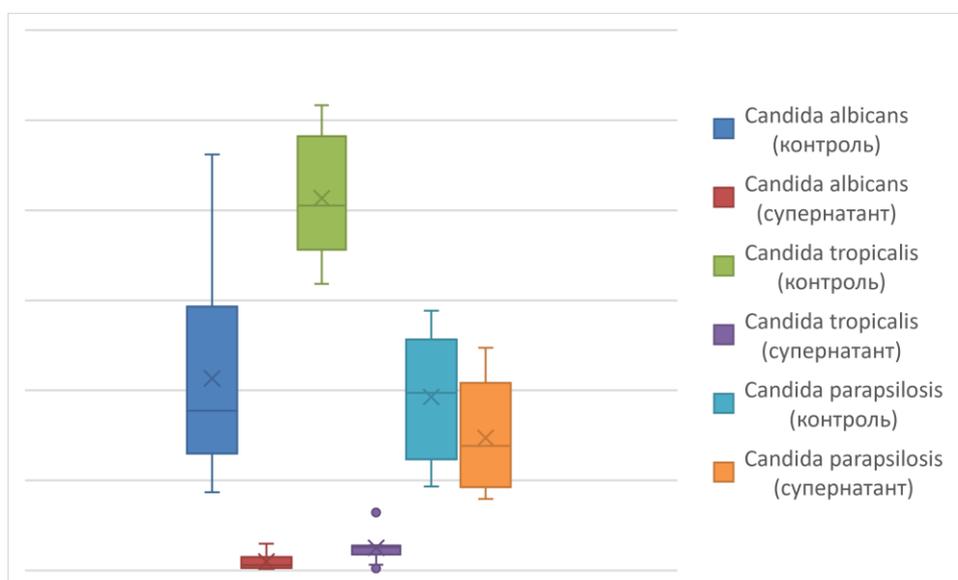


Рисунок 4-График формирования биопленок микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 37°C

Обсуждение

При температуре 37°C для всех видов микроскопических грибов рода *Candida* наблюдали снижение биоплёнкообразования на средах с добавлением супернатанта *L. plantarum* 8PA-3 по сравнению с контрольными средами. Наиболее выраженные изменения были характерны для *Candida albicans* и *Candida tropicalis*. В то же время снижение площади обрастания у *Candida parapsilosis* по сравнению с контрольными образцами не было статистически значимым. Для всех исследуемых видов было характерно увеличение числа патологически изменённых и разрушенных клеток на средах с добавлением супернатанта по сравнению с контрольными. На основании этих данных можно сделать вывод, что супернатант лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3 при температуре 37°C действительно оказывал ингибирующее действие на образование биоплёнок

микроскопическими грибами рода *Candida*, хотя для *Candida parapsilosis* эффект был статистически незначимым. Кроме того, супернатант *L. plantarum* 8РА-3 приводил к изменению морфологических свойств клеток всех исследуемых видов.

Формирование биопленок микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 39°C

В ходе данного опыта культуры микроскопических грибов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* высевали в 18 стерильных чашек Петри диаметром 40 мм из полистерола с подготовленной средой. Вводили по 0,1 мл суспензии *Candida spp.* с плотностью 0,5 по МакФарланду (МУК 4.2.1890-04). Штаммы культивировали в контрольной среде (10 мл бульона Мюллер-Хинтон), среде, содержащей фосфатный буфер (10 мл бульона Мюллер-Хинтон и 0,5 мл фосфатного буфера), среде, содержащей молочную кислоту (10 мл бульона Мюллер-Хинтон и 4 мг молочной кислоты), среде, содержащей супернатант (5 мл бульона Мюллер-Хинтон и 5 мл супернатанта), среде, содержащей супернатант и фосфатный буфер (5 мл бульона Мюллер-Хинтон, 5 мл супернатанта и 0,5 мл фосфатного буфера), среде, содержащей супернатант и молочную кислоту (5 мл бульона Мюллер-Хинтон, 5 мл супернатанта и 4 мг молочной кислоты). Культивирование проводилось в термостате в течение 48 часов при температуре 39°C. Оптические фотографии, сделанные при помощи световой микроскопии, представлены на рис. 5–10.

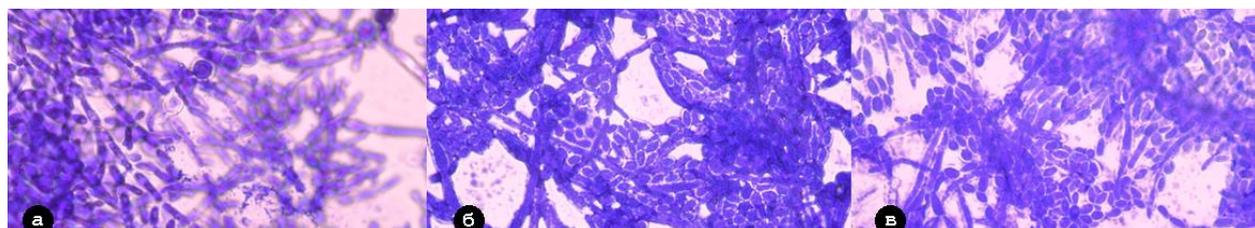


Рисунок 5 - СМ. Клетки *C. albicans*, на контрольной среде (а), на среде с молочной кислотой (б), на среде с фосфатным буферным раствором (в). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

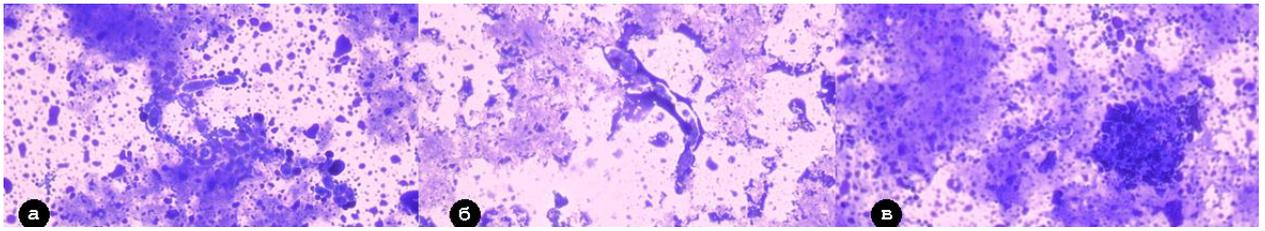


Рисунок 6 - СМ. Клетки *C. albicans*, на среде с супернатантом лактобактерий (а), на среде с супернатантом лактобактерий и молочной кислотой (б), на среде с супернатантом лактобактерий и буферным раствором (в). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

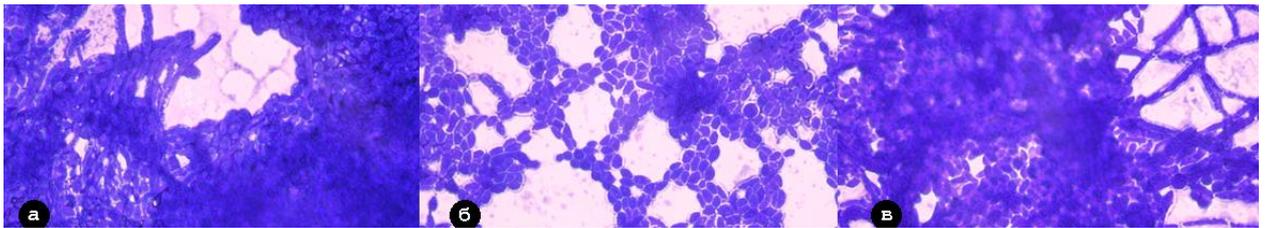


Рисунок 7 - СМ. Клетки *C. tropicalis*, на контрольной среде (а), на среде с молочной кислотой (б), на среде с фосфатным буферным раствором (в). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

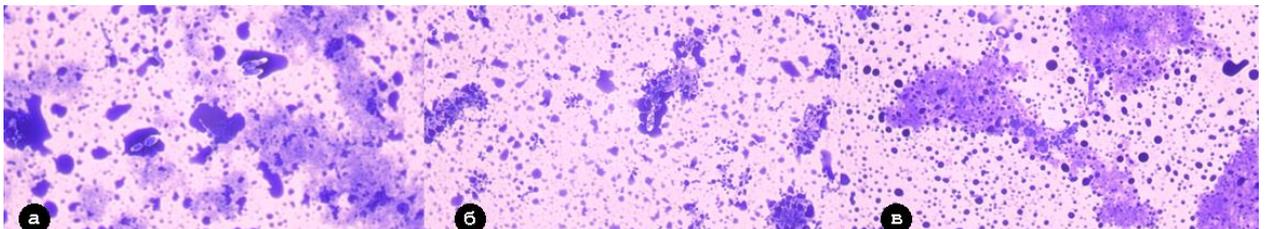


Рисунок 8 - СМ. Клетки *C. tropicalis*, на среде с супернатантом лактобактерий (а), на среде с супернатантом лактобактерий и молочной кислотой (б), на среде с супернатантом лактобактерий и буферным раствором (в). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

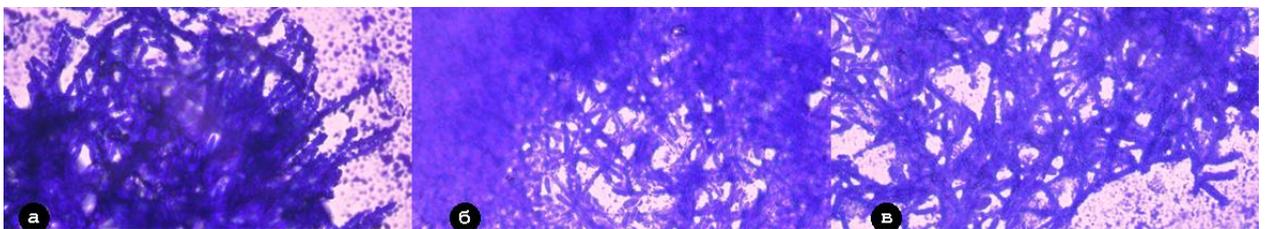


Рисунок 9 - СМ. Клетки *C. parapsilosis*, на контрольной среде (а), на среде с молочной кислотой (б), на среде с фосфатным буферным раствором (в). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

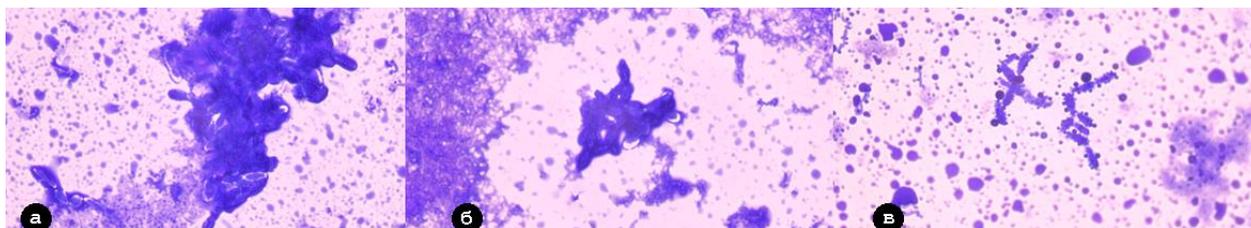


Рисунок 10 - СМ. Клетки *C. parapsilosis*, на среде с супернатантом лактобактерий (а), на среде с супернатантом лактобактерий и молочной кислотой (б), на среде с супернатантом лактобактерий и буферным раствором (в). Окраска генцианвиолет. Увеличение x1000

Изменение биоплёнкообразования по сравнению с контрольной средой отражено в следующей таблице 1.

Таблица 1

Изменение площади обрастания субстрата микроскопическими грибами рода *Candida* по сравнению с контрольной средой при температуре 39°C

Среда, сравниваемая с контрольной	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
С фосфатным буфером	117,0% (p=0,14)	115,6% (p=0,36)	269,4% (p<0,05)
С молочной кислотой	77,1% (p=0,09)	117,6% (p=0,30)	224,9% (p<0,05)
С супернатантом	2,3% (p<0,05)	2,0% (p<0,05)	29,0% (p<0,05)
С супернатантом и фосфатным буфером	1,6% (p<0,05)	3,1% (p<0,05)	5,2% (p<0,05)
С супернатантом и молочной кислотой	1,7% (p<0,05)	1,4% (p<0,05)	16,5% (p<0,05)

Изменение биоплёнкообразования в средах с добавлением супернатанта, а также фосфатного буфера и молочной кислоты по сравнению со средой с супернатантом отражено в следующей таблице 2.

Таблица 2

Изменение площади обрастания субстрата микроскопическими грибами рода *Candida* по сравнению со средой с добавлением супернатанта при температуре 39°C

Среда, сравниваемая со средой с супернатантом	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
С супернатантом и фосфатным буфером	69,7% (p=0,42)	155,7% (p=0,1)	17,9% (p<0,05)
С супернатантом и молочной кислотой	72,7% (p=0,48)	71,8% (p=0,2)	57,0% (p=0,18)

Полученные данные визуализированы в виде следующих диаграмм размаха (рис. 11–13):

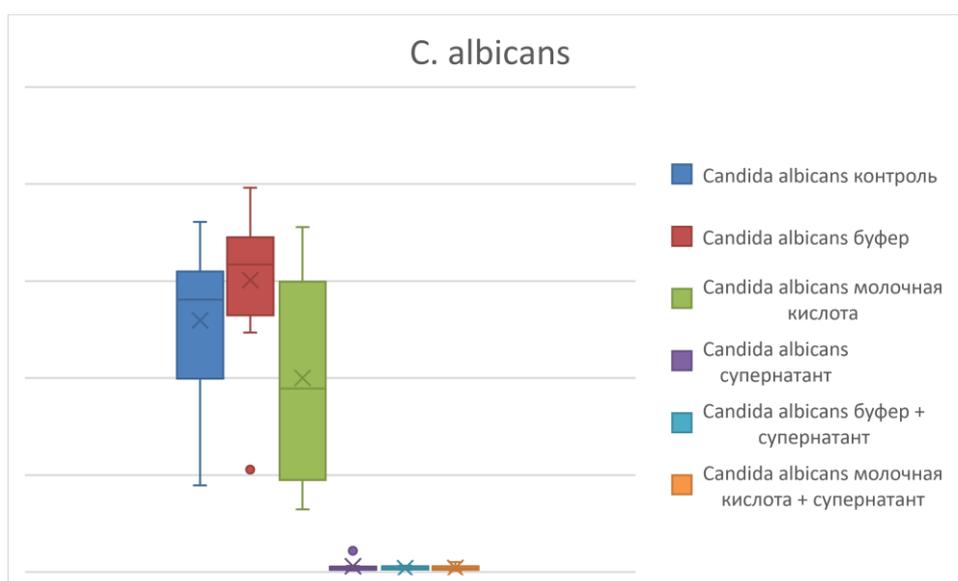


Рисунок 11 - График формирования биопленок микроскопических грибов *Candida albicans* при температуре 39°C

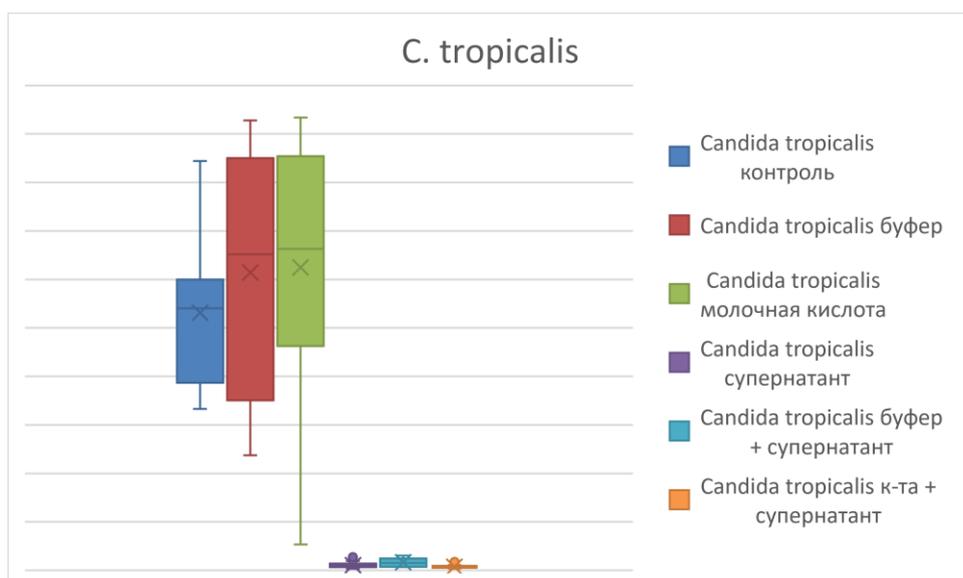


Рисунок 12-График формирования биопленок микроскопических грибов *Candida tropicalis* при температуре 39°C

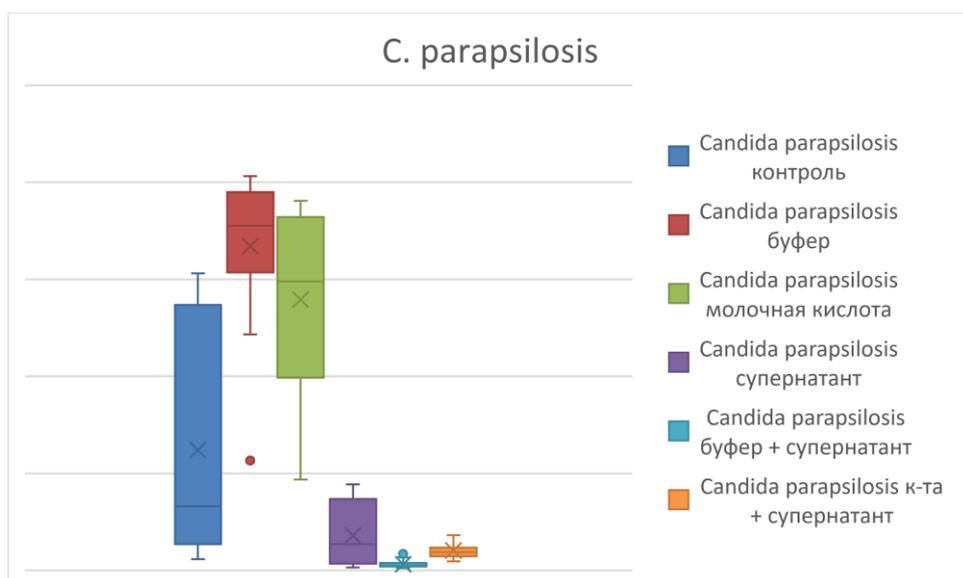


Рисунок 13-График формирования биопленок микроскопических грибов *Candida parapsilosis* при температуре 39°C

Обсуждение

При температуре 39°C наблюдали статистически значимое снижение площади обрастания субстрата в средах с добавлением супернатанта лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3 по сравнению с контрольными средами для всех исследуемых видов. Данный эффект отмечали как на средах с добавлением исключительно супернатанта, так и на средах с добавлением,

помимо супернатанта лактобактерий, фосфатного буферного раствора или молочной кислоты. Для *C. albicans* и *C. tropicalis* не отмечали статистически значимого эффекта, оказываемого молочной кислотой или фосфатным буферным раствором как на контрольных, так и на опытных средах. На контрольных средах с добавлением молочной кислоты или фосфатного буфера площадь обрастания субстрата *C. parapsilosis* была значительно выше; на среде с добавлением супернатанта лактобактерий и фосфатного буфера наблюдали существенно меньшее биоупленкообразование *C. parapsilosis* по сравнению со средой с добавлением супернатанта. В остальных случаях изменение биоупленкообразования *C. parapsilosis* было статистически незначимо. Для всех исследуемых видов было характерно увеличение числа патологически измененных и разрушенных клеток на средах с добавлением супернатанта по сравнению с контрольными, однако добавление молочной кислоты или фосфатного буфера не приводило к таким изменениям. Таким образом, при температуре 39°C супернатант лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3 ингибировал биоупленкообразование всех исследуемых видов микроскопических грибов рода *Candida* и приводил к изменению морфологии клеток, а также нарушениям клеточного деления. Добавление фосфатного буфера или молочной кислоты приводило у *C. parapsilosis* к увеличению площади обрастания субстрата на контрольных средах и снижению – на опытных; для остальных видов статистически значимых изменений не было.

Формирование биопленок микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 30°C

В ходе данного эксперимента культуры микроскопических грибов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* высевали в 18 стерильных чашек Петри диаметром 40 мм из полистерола с подготовленной средой. Вводили по 0,1 мл суспензии *Candida spp.* с плотностью 0,5 по МакФарланду (МУК 4.2.1890-04). Штаммы культивировали в контрольной среде (2 мл бульона

Мюллер-Хинтон), среде, содержащей фосфатный буфер (2 мл бульона Мюллер-Хинтон и 0,1 мл фосфатного буфера), среде, содержащей молочную кислоту (2 мл бульона Мюллер-Хинтон и 0,8 мг молочной кислоты), среде, содержащей супернатант (1 мл бульона Мюллер-Хинтон и 1 мл супернатанта), среде, содержащей супернатант и фосфатный буфер (1 мл бульона Мюллер-Хинтон, 1 мл супернатанта и 0,1 мл фосфатного буфера), среде, содержащей супернатант и молочную кислоту (1 мл бульона Мюллер-Хинтон, 1 мл супернатанта и 0,8 мг молочной кислоты). Культивирование проводили в термостате в течение 48 часов при температуре 30°C. Оптические фотографии, сделанные при помощи световой микроскопии, представлены на рис. 14–19.

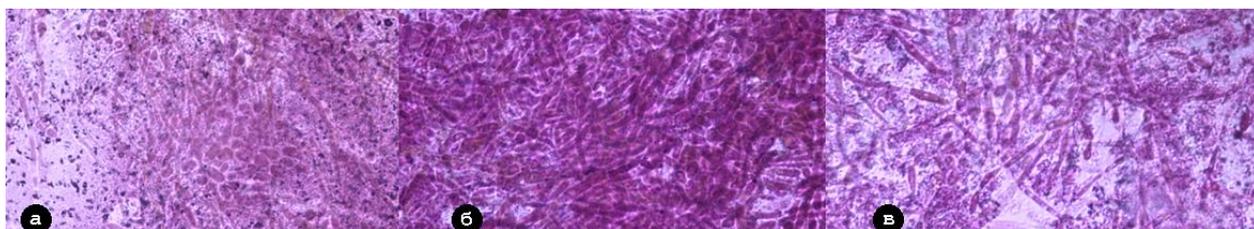


Рисунок 14 - СМ. Клетки *C. albicans*, на контрольной среде (а), на среде с молочной кислотой (б), на среде с фосфатным буферным раствором (в). Окраска фуксин. Увеличение x1000

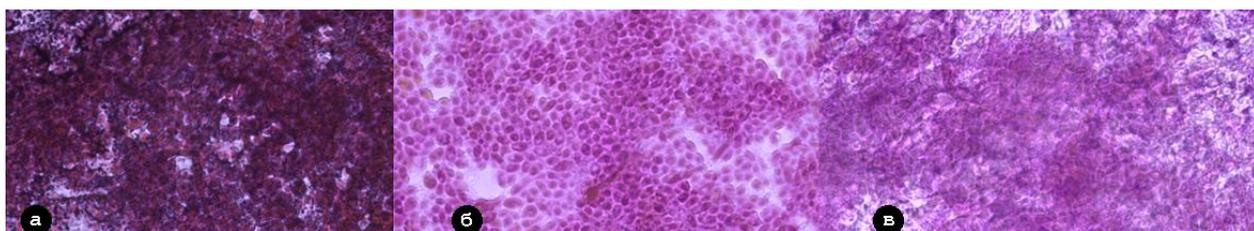


Рисунок 15 - СМ. Клетки *C. albicans*, на среде с супернатантом лактобактерий (а), на среде с супернатантом лактобактерий и молочной кислотой (б), на среде с супернатантом лактобактерий и буферным раствором (в). Окраска фуксин. Увеличение x1000

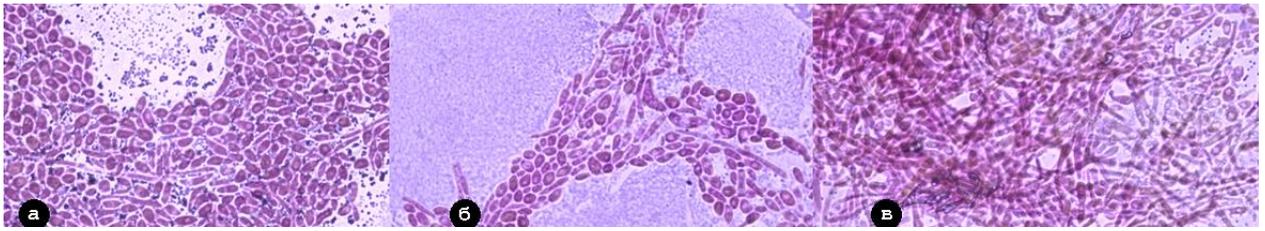


Рисунок 16 - СМ. Клетки *C. tropicalis*, на контрольной среде (а), на среде с молочной кислотой (б), на среде с фосфатным буферным раствором (в). Окраска фуксин. Увеличение x1000

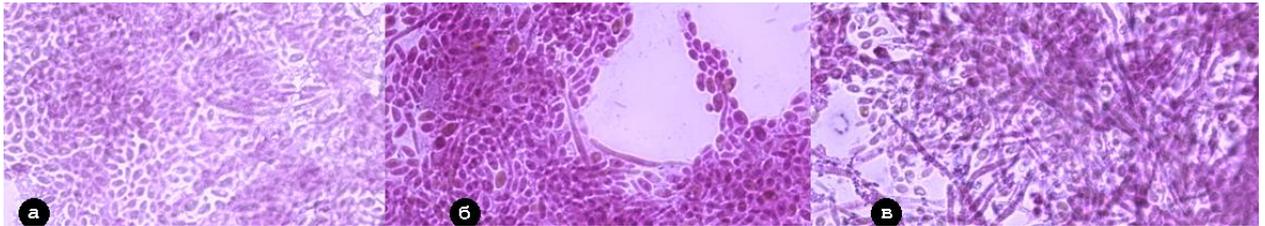


Рисунок 17 - СМ. Клетки *C. tropicalis*, на среде с супернатантом лактобактерий (а), на среде с супернатантом лактобактерий и молочной кислотой (б), на среде с супернатантом лактобактерий и буферным раствором (в). Окраска фуксин. Увеличение x1000



Рисунок 18 - СМ. Клетки *C. parapsilosis*, на контрольной среде (а), на среде с молочной кислотой (б), на среде с фосфатным буферным раствором (в). Окраска фуксин. Увеличение x1000

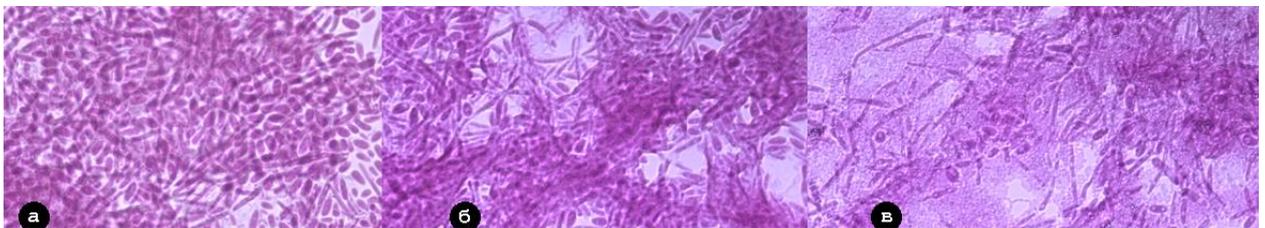


Рисунок 19 - СМ. Клетки *C. parapsilosis*, на среде с супернатантом лактобактерий (а), на среде с супернатантом лактобактерий и молочной кислотой (б), на среде с супернатантом лактобактерий и буферным раствором (в). Окраска фуксин. Увеличение x1000

Изменение биоплёнкообразования по сравнению с контрольной средой отражено в следующей таблице 3.

Таблица 3

Изменение площади обрастания субстрата микроскопическими грибами рода *Candida* по сравнению со средой с добавлением супернатанта при температуре 30°C

Среда, сравниваемая с контрольной	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
С фосфатным буфером	347,5% (p<0,05)	59,1% (p=0,14)	42,1% (p<0,05)
С молочной кислотой	289,4% (p<0,05)	76,8% (p=0,41)	102,7% (p=0,83)
С супернатантом	287,3% (p<0,05)	92,4% (p=0,78)	108,1% (p=0,64)
С супернатантом и фосфатным буфером	640,3% (p<0,05)	145,4% (p<0,05)	48,5% (p=0,37)
С супернатантом и молочной кислотой	672,4% (p<0,05)	156,1% (p<0,05)	110,6% (p=0,54)

Изменение биоплёнокообразования в средах с добавлением супернатанта, а также фосфатного буфера и молочной кислоты по сравнению со средой с супернатантом отражено в следующей таблице 4.

Таблица 4

Изменение площади обрастания субстрата микроскопическими грибами рода *Candida* по сравнению со средой с добавлением супернатанта при температуре 30°C

Среда, сравниваемая со средой с супернатантом	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
С супернатантом и фосфатным буфером	222,9% (p<0,05)	157,4% (p=0,10)	44,9% (p<0,05)
С супернатантом и	234,1%	169,0%	102,3% (p=0,88)

молочной кислотой	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)	
-------------------	----------------	----------------	--

Полученные данные визуализированы в виде следующих диаграмм размаха (рис. 20, 21, 22):

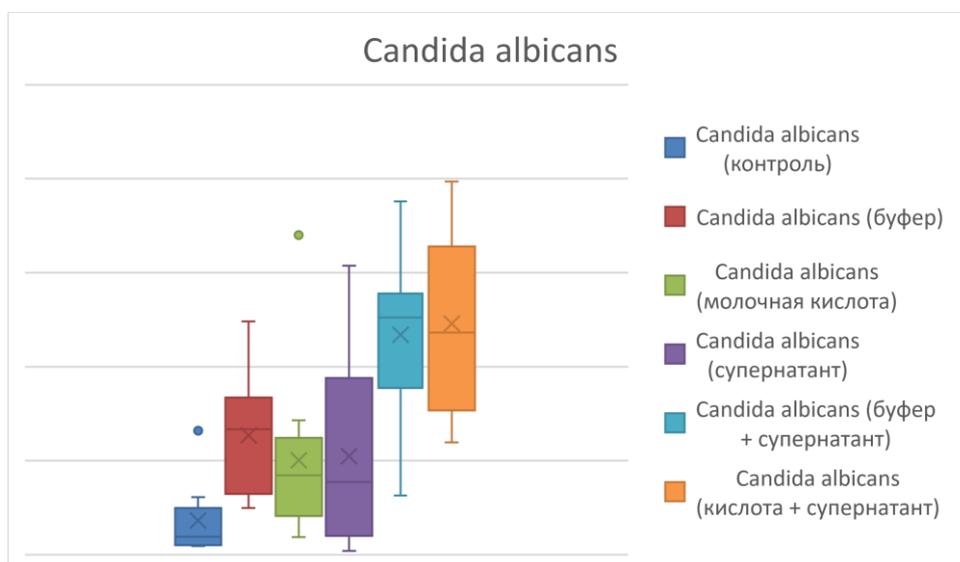


Рисунок 20 - График формирования биопленок микроскопических грибов *Candida albicans* при температуре 30°C

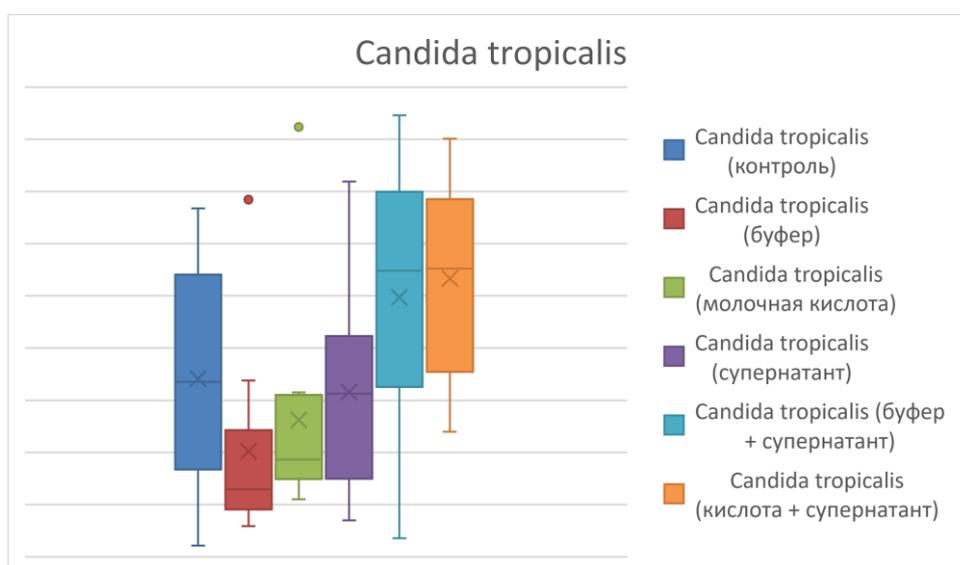


Рисунок 21- График формирования биопленок микроскопических грибов *Candida tropicalis* при температуре 30°C

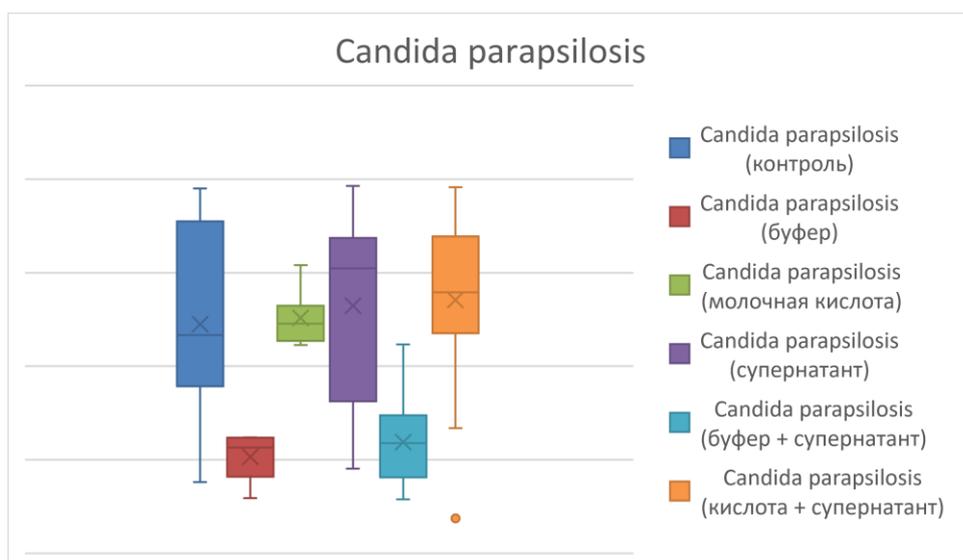


Рисунок 22 - График формирования биопленок микроскопических грибов *Candida parapsilosis* при температуре 30°C

Обсуждение

При температуре 30°C биоплёнкообразование *C. albicans* значительно увеличивалось по сравнению с контрольной средой на средах с добавлением фосфатного буфера, молочной кислоты и/или супернатанта лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3, а также на средах с добавлением супернатанта лактобактерий и фосфатного буфера или молочной кислоты по сравнению со средами с добавлением только супернатанта. Для *C. tropicalis* было характерно увеличение обрастания субстрата по сравнению с контролем на средах с супернатантом лактобактерий и фосфатным буферным раствором или молочной кислотой, а также на среде с супернатантом лактобактерий и фосфатным буфером по сравнению со средой только с супернатантом лактобактерий. Также добавление фосфатного буферного раствора приводило к статистически значимому снижению биоплёнкообразования *C. parapsilosis*, как в контрольных, так и в опытных средах. В остальных случаях не обнаруживали статистически значимого изменения биоплёнкообразования *C. parapsilosis* между разными средами. Значимых морфологических различий и нарушений клеточного деления не наблюдали ни у одного из исследуемых видов. Таким образом, при температуре 30°C не

наблюдали единообразия эффектов, оказываемых супернатантом, фосфатным буфером или молочной кислотой. Супернатант при данной температуре не оказывал ингибирующего эффекта ни на один из исследуемых видов, не приводил к морфологическим изменениям или нарушениям деления клеток. Добавление фосфатного буферного раствора приводило к увеличению площади обрастания субстрата *C. tropicalis*, но снижению *C. parapsilosis*.

Результаты

Основываясь на данных, полученных в ходе исследования по методу O'Tolle, можно сделать следующий вывод: добавление супернатанта лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3 в среды культивирования приводило к ингибированию биоплёнкообразования микроскопических грибов рода *Candida* при 37°C и 39°C, что было особенно характерно для *C. albicans* и *C. tropicalis*, но не оказывал статистически значимого ингибирующего эффекта при 30°C. Фосфатный буферный раствор и молочная кислота не демонстрировали устойчивую тенденцию к изменению биоплёнкообразования.

3.2. Метод сканирующей электронной микроскопии

В ходе данного опыта культуры микроскопических грибов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* высевали в 6 стерильных чашек Петри диаметром 40 мм из полистерола с подготовленной средой, таким образом, чтобы на каждый из исследуемых штаммов приходилась чашка Петри с контрольной средой и чашка Петри с 1 мл суспензии лактобактерий. Вводили по 0,1 мл суспензии *Candida spp.* с плотностью 0,5 по МакФарланду (МУК 4.2.1890-04). Образцы культивировали в термостате в течение 48 часов при температуре 30, 37 и 39°C, после чего исследовали методом сканирующей электронной микроскопии. Для объективной оценки изменений клеток микроскопических грибов измеряли поперечный размер клеток.

Морфологические свойства клеток микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 37°C

Клетки *C. albicans*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 124,6%, по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Клетки *C. tropicalis*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 153,4%, по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Клетки *C. parapsilosis*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 109,4%, по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Электронные фотографии, сделанные при помощи сканирующей электронной микроскопии, представлены на рис. 23–25.

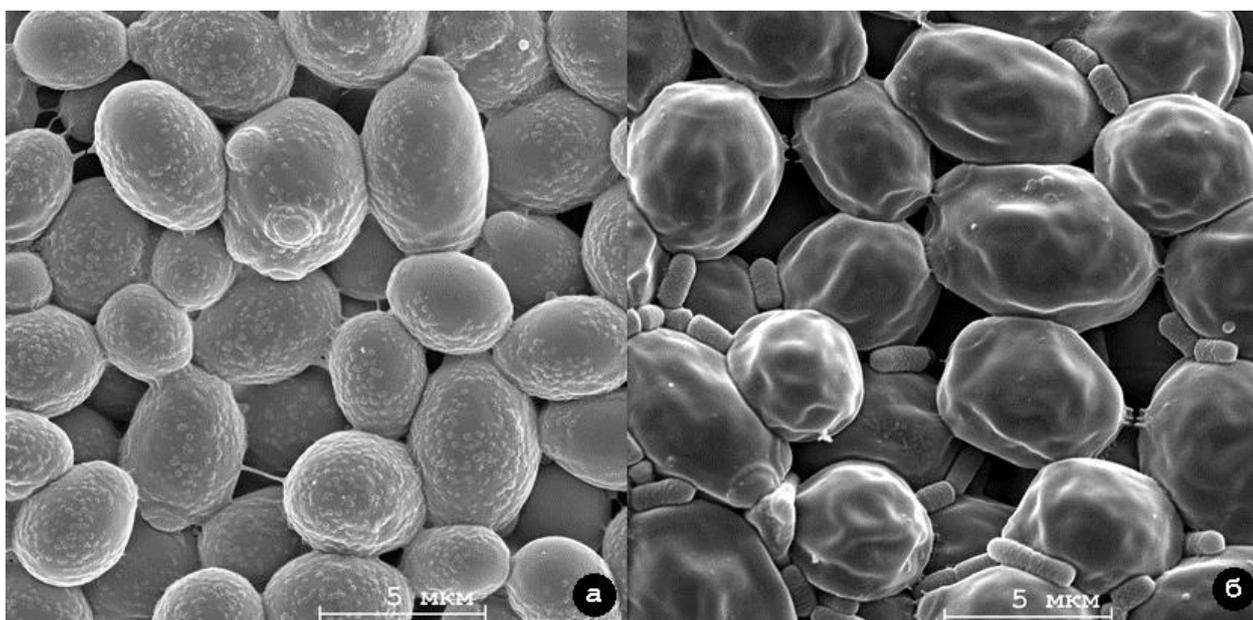


Рисунок 23. СЭМ. Клетки *C. albicans* на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение $\times 20000$.

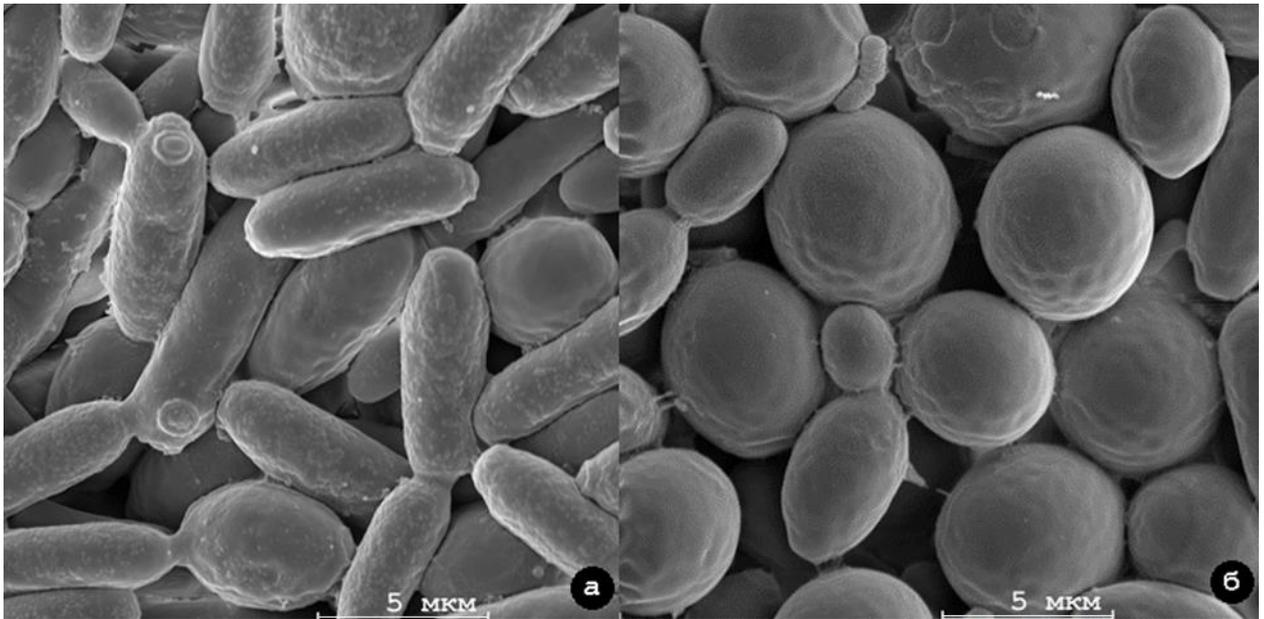


Рисунок 24. СЭМ. Клетки *C. tropicalis* на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение $\times 20000$.

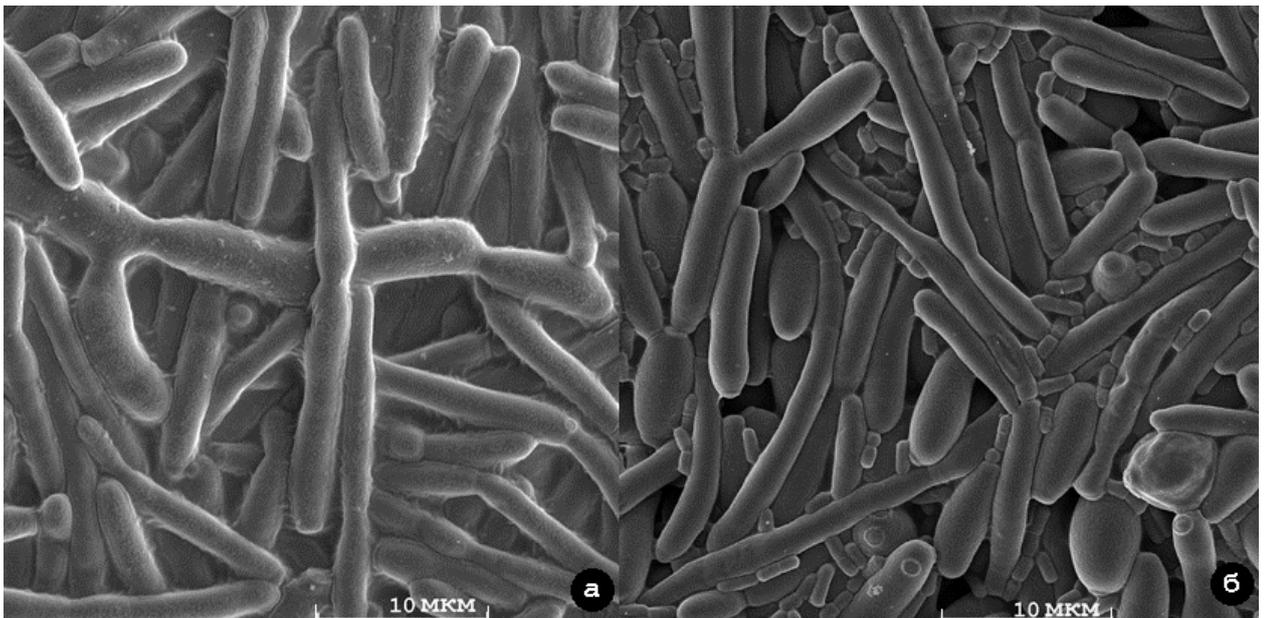


Рисунок 25 - СЭМ. Клетки *C. parapsilosis*, на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение $\times 20000$.

Для визуализации полученных результатов построена следующая диаграмма размаха (рис. 26):

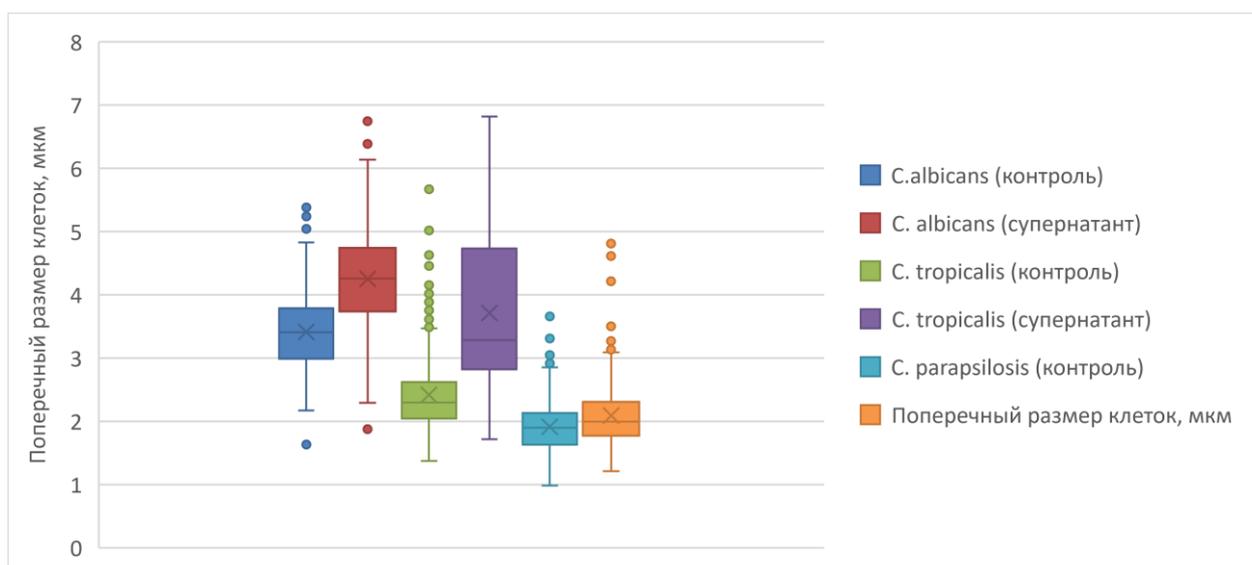


Рисунок 26 - График поперечных размеров клеток микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 37°C

Обсуждение

При температуре 37°C наблюдали статистически значимое увеличение размеров клеток всех исследуемых видов микроскопических грибов рода *Candida* на средах с добавлением суспензии лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3, по сравнению с контрольными средами. Кроме того, отмечали изменение морфологических свойств клеток в опытных образцах: для них характерна более гладкая поверхность клеточной стенки, по сравнению с клетками на контрольной среде. Таким образом, добавление суспензии лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3 оказывало статистически значимый эффект на клетки микроскопических грибов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* при 39°C.

Морфологические свойства клеток микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 39°C

Клетки *C. albicans*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 135,9%, по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Клетки *C. tropicalis*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 93,0%, по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Клетки *C. parapsilosis*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 90,4%, по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Электронные фотографии, сделанные при помощи сканирующей электронной микроскопии, представлены на рис. 27–29.

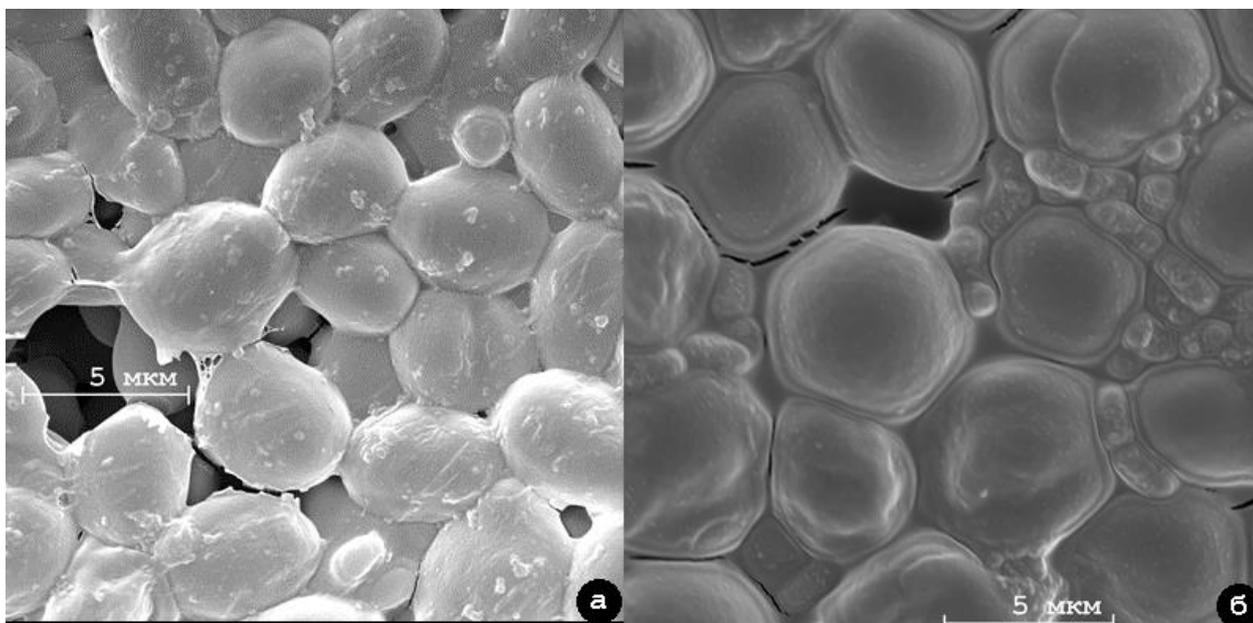


Рисунок 27 - СЭМ. Клетки *C. albicans*, на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение $\times 20000$.

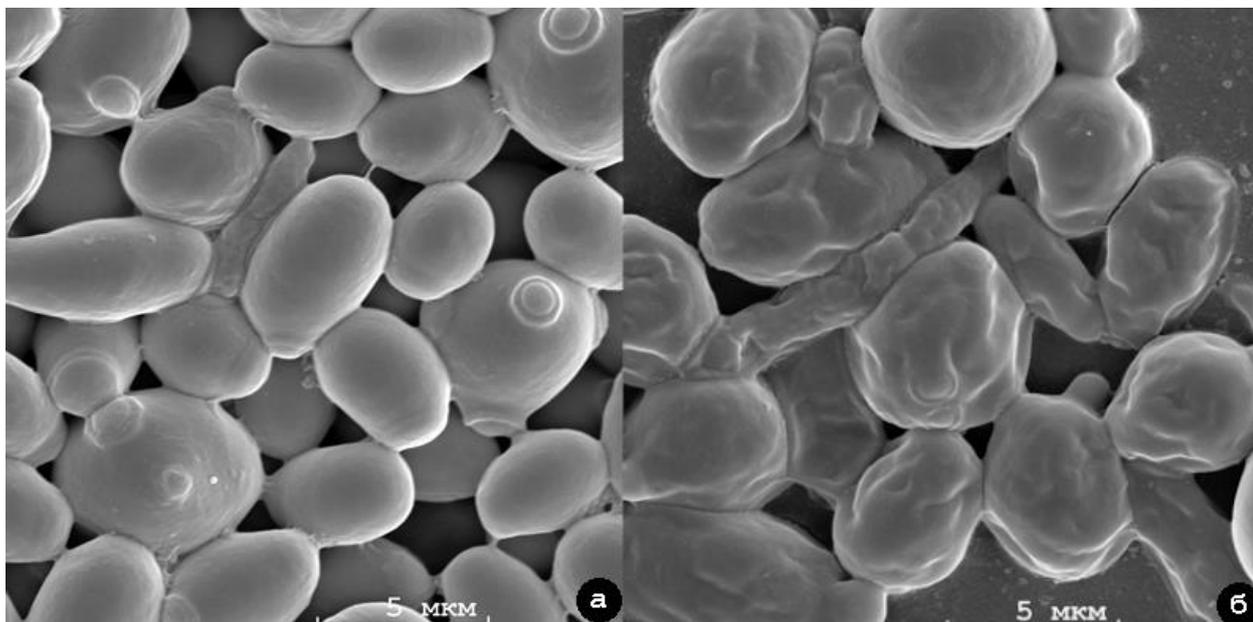


Рисунок 28 - СЭМ. Клетки *C. tropicalis*, на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение $\times 20000$.

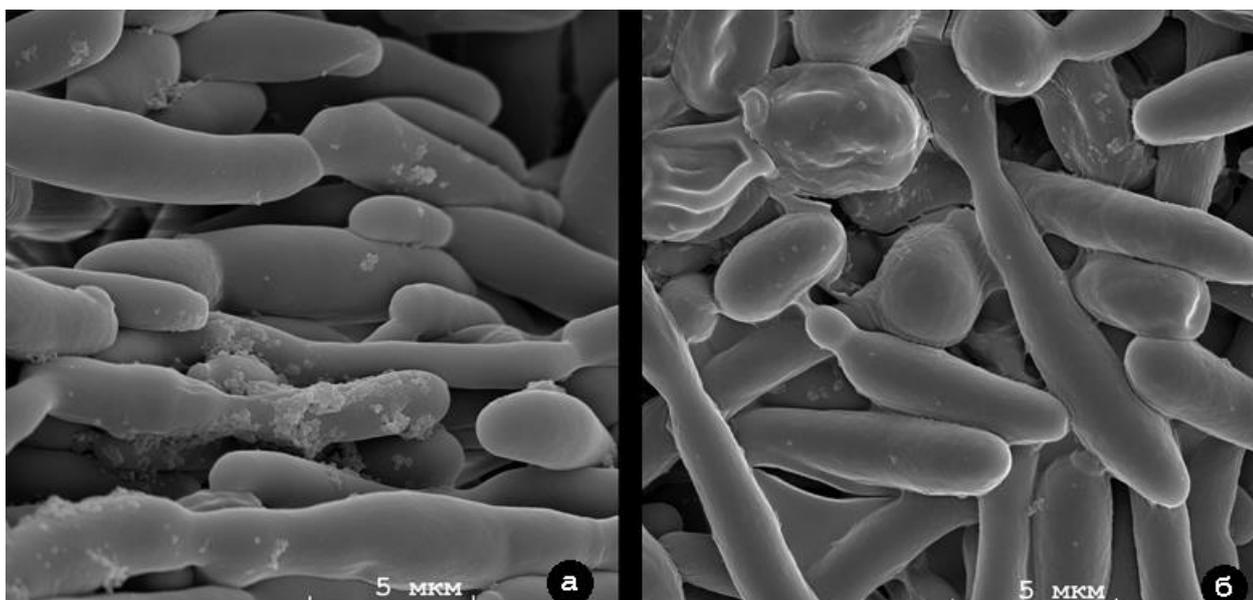


Рисунок 29 - СЭМ. Клетки *C.parapsilosis*, на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение x20000.

Для визуализации полученных результатов построена следующая диаграмма размаха (рис. 30):

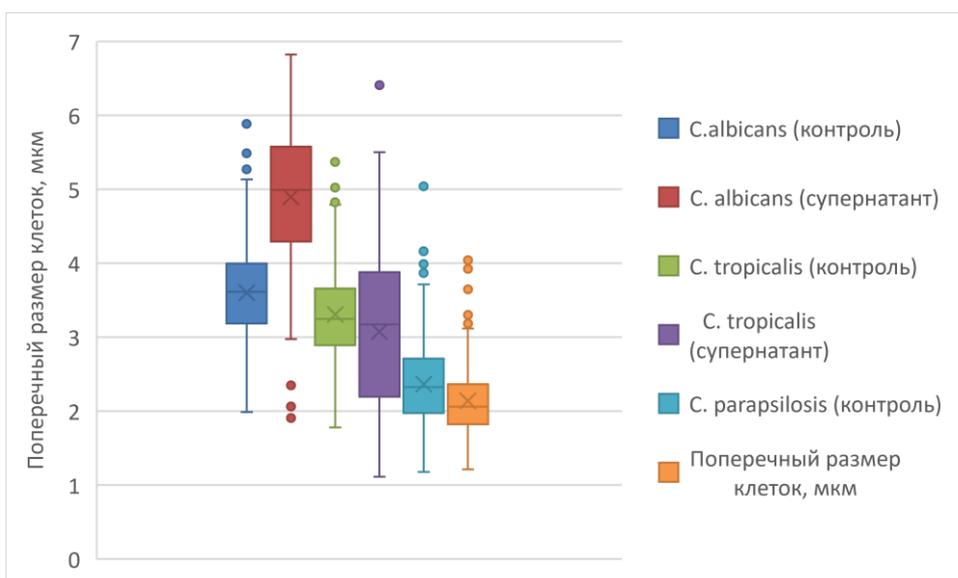


Рисунок 30. График поперечных размеров клеток микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 39°C

Обсуждение

При температуре 39°C наблюдали статистически значимое увеличение размеров клеток всех исследуемых видов микроскопических грибов рода

Candida на средах с добавлением суспензии лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3, по сравнению с контрольными средами. Кроме того, отмечали изменение морфологических свойств клеток в опытных образцах: для них характерна более гладкая поверхность клеточной стенки по сравнению с клетками на контрольной среде. Таким образом, добавление суспензии лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3 оказывало статистически значимый эффект на клетки микроскопических грибов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* при 39°C.

Морфологические свойства клеток микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 30°C

Клетки *C. albicans*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 97,7%, по сравнению с контролем ($p=0,0570$).

Клетки *C. tropicalis*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 96,3%, по сравнению с контролем ($p=0,1482$).

Клетки *C. parapsilosis*: средний размер клеток в опытных образцах составлял 103,0%, по сравнению с контролем ($p=0,2876$).

Электронные фотографии, сделанные при помощи сканирующей электронной микроскопии, представлены на рис. 31–33.

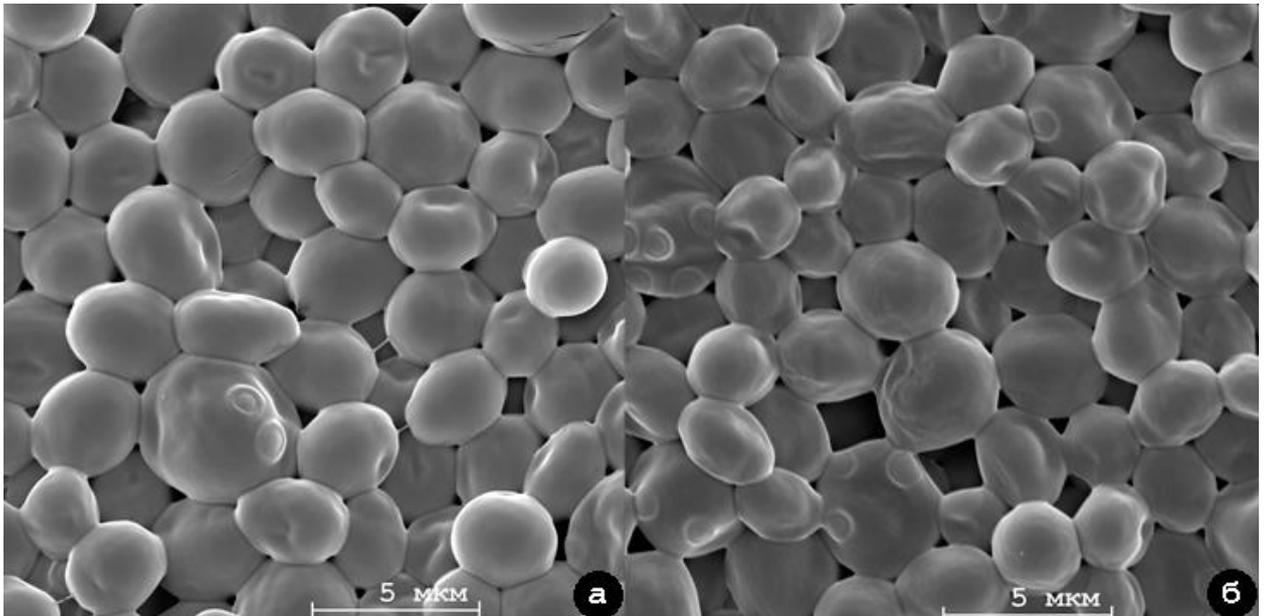


Рисунок 31 - СЭМ. Клетки *C. albicans*, на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение x20000.

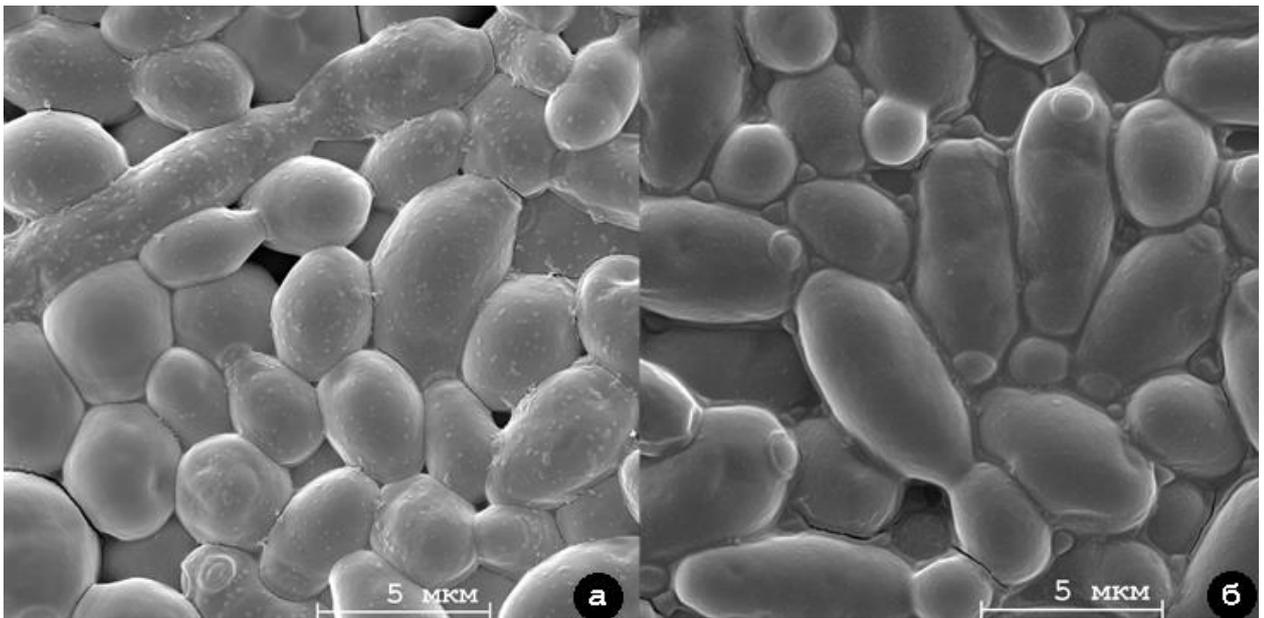


Рисунок 32 - СЭМ. Клетки *C. tropicalis*, на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение x20000.

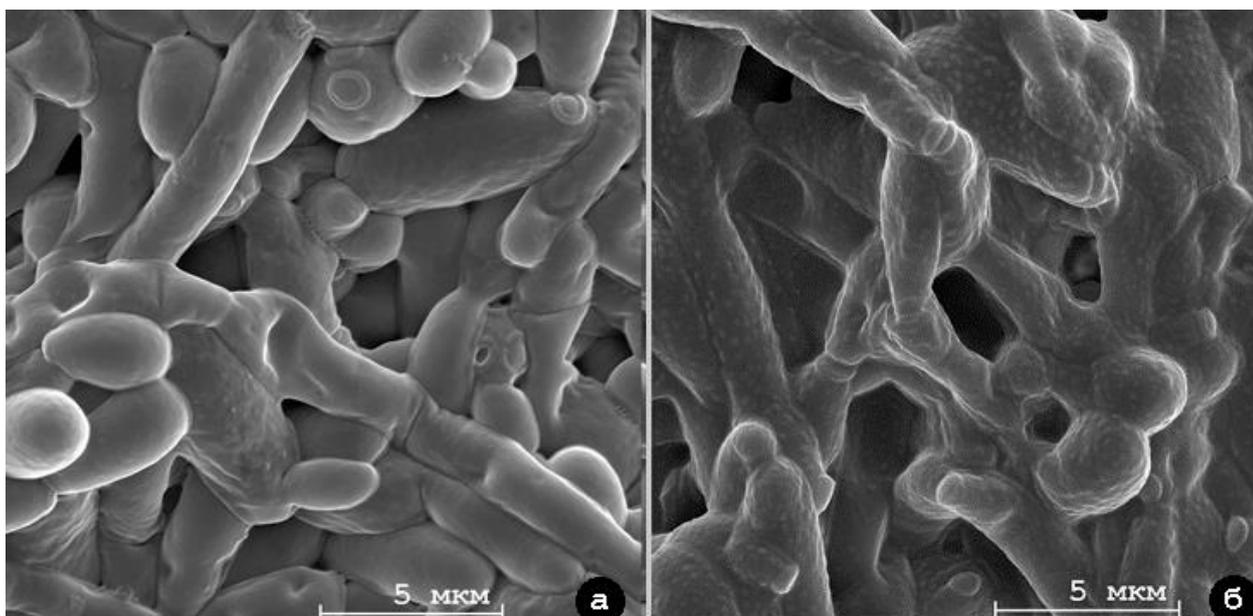


Рисунок 33 - СЭМ. Клетки *C. parapsilosis*, на контрольной среде (а), на среде с суспензией лактобактерий (б). Увеличение x20000.

Для визуализации полученных результатов построена следующая диаграмма размаха (рис. 34):

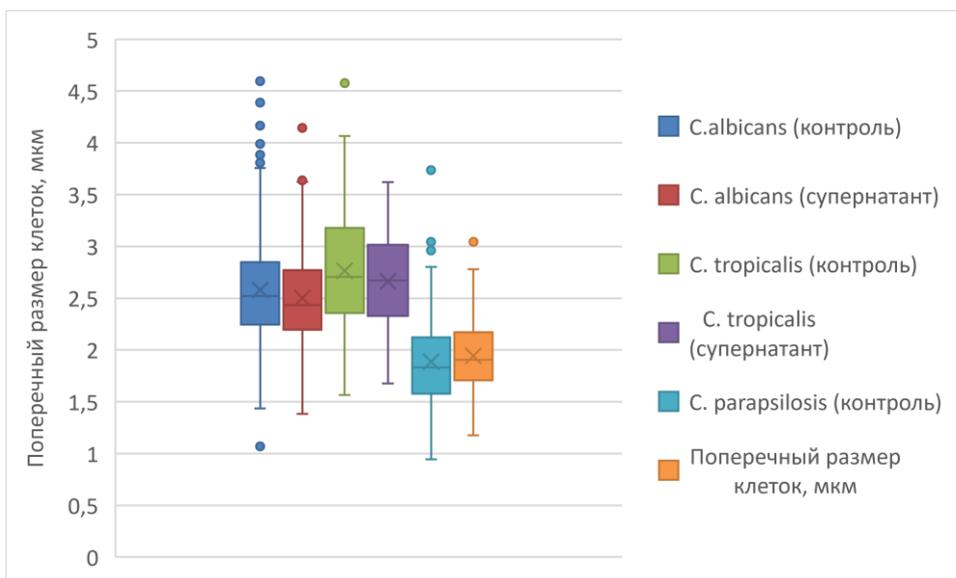


Рисунок 34 - График поперечных размеров клеток микроскопических грибов рода *Candida* при температуре 30°C

Обсуждение

При температуре 30°C наблюдали увеличение размеров клеток *Candida albicans* и *Candida tropicalis* и уменьшение размеров клеток *Candida*

parapsilosis на средах с добавлением суспензии лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3, по сравнению с контрольными средами. Тем не менее, все эти изменения оказались статистически незначимыми. Устойчивой тенденции к различиям по морфологическим свойствам между клетками на контрольных средах и на средах с добавлением суспензии лактобактерий не обнаружено. Таким образом, добавление суспензии лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3 не оказывало статистически значимое воздействие на клетки микроскопических грибов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* при 30°C.

3.3. Заключение

В контрольных образцах всех исследованных культур *Candida* выявлены многослойные скопления клеток в виде биопленок. Микроскопические грибы имели характерную стандартную форму и размеры клеток. Добавление буфера и молочной кислоты в контрольные образцы к статистически значимым изменениям не приводило. Добавление в среду выращивания грибов супернатанта *L. plantarum* 8РА-3 вызывало при 37 и 39°C уменьшение площади формирования биопленок в 3–72 раза, увеличение численности деструктурированных и лизированных клеток.

Сочетанное воздействие супернатанта *L. plantarum* 8РА-3 с буфером или кислотой не приводило к существенным изменениям указанных выше параметров роста грибов при температуре 30 и 39°C. Поскольку при этих условиях ожидалось соответственно ингибирование и потенцирование эффекта, оказываемого молочной кислотой, можно предположить, что основным механизмом воздействия супернатанта не являлось воздействие молочной кислотой. Лактобактерии *L. plantarum* 8РА-3 способны вырабатывать и другие факторы агрессии [49,50], которые, вероятно, вносят основной вклад в подавление роста и биоплёнкообразования грибов рода *Candida*.

В опытных образцах *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* при 37 и 39°C наблюдали статистически значимое увеличение размеров клеток, по сравнению с контролем, а также изменение структуры клеточной стенки. В то же время существенных изменений при температуре 30°C обнаружено не было. Микроскопические грибы рода *Candida* обладают сложным механизмом регуляции метаболических процессов, который влияет в том числе и на размеры клеток [51], поэтому увеличение размера клеток может быть как проявлением реакции непосредственно клеток микроскопических грибов, так и патологическим процессом, развившимся в результате агрессивного влияния факторов, выделяемых лактобактериями *L. plantarum*.

Таким образом, в ходе анализа полученных данных обнаружено, что супернатант *L. plantarum* 8РА-3 вызывал существенное снижение способности к биоплёнкообразованию всех исследованных видов грибов *Candida*. На уровне световой микроскопии выявлены признаки ингибирования развития биопленок *Candida spp.* супернатантом лактобактерий. На уровне электронной микроскопии выявлены признаки изменения морфологических свойств клеток *Candida spp.* Изменение рН среды до 3.5 не отразилось на морфологических свойствах клеток и биопленок грибов. Значительные изменения морфологических свойств клеток грибов при воздействии супернатанта свидетельствовали о деструктивных процессах, ведущих к их деградации.

Вырабатываемые лактобактериями *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 факторы агрессии оказывали выраженное подавляющее действие на клетки и биоплёнки микроскопических грибов рода *Candida*, причём молочная кислота не являлась основным фактором агрессии. Этот эффект находится в прямой зависимости с температурными условиями и не зависит от рН окружающей среды.

3.4. Выводы

1. Способность микроскопических грибов рода *Candida* к формированию биоплёнок при воздействии супернатанта *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 различается при разных температурных режимах культивирования: супернатант лактобактерий ингибирует биоплёнкообразование при температуре 37 и 39°C, но не 30°C.
2. Добавление раствора фосфатного буфера и молочной кислоты не оказывало значимого эффекта на клетки грибов рода *Candida* и их биоплёнки.
3. Анализ биоплёнкообразования и морфологических изменений в клетках грибов рода *Candida* при сочетанном воздействии супернатанта *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 и раствора фосфатного буфера либо молочной кислоты показал, что добавление супернатанта лактобактерий приводит к деструктивным морфологическим изменениям и нарушению формирования биоплёнок грибов рода *Candida*, однако раствор фосфатного буфера и молочная кислота не оказывают значимого эффекта при сочетанном воздействии.

Список литературы

1. Roy R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action // *Virulence*. 2017. Vol. 9, № 1. P. 522–554.
2. Aparna M.S., Yadav S. Biofilms: microbes and disease // *Braz J Infect Dis*. 2008. Vol. 12, № 6. P. 526–530.
3. Савилов Е.Д. et al. Бактериальные биоплёнки при гнойно-септических инфекциях: 5 // *Acta Biomedica Scientifica*. Россия, Иркутск: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 2019. Vol. 4, № 5. P. 38–42.
4. Yin W. et al. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, № 14. P. 3423.
5. Zijngel V. et al. Oral biofilm architecture on natural teeth // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 2. P. e9321.

6. Kalia N., Singh J., Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2020. Vol. 19, № 1. P. 5.
7. Рыбальченко Оксана Владимировна, Бондаренко Виктор Михайлович, Добрица Валерий Павлович. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека. СПб: ИИЦ ВММ, 2008. 112 p.
8. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms // *Clin Microbiol Rev.* 2002. Vol. 15, № 2. P. 167–193.
9. Gulati M., Nobile C.J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms // *Microbes Infect.* 2016. Vol. 18, № 5. P. 310–321.
10. Donlan R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces // *Emerg Infect Dis.* 2002. Vol. 8, № 9. P. 881–890.
11. Хрянин А.А. БИОПЛЁНКИ МИКРООРГАНИЗМОВ: СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ: 5–6 // Антибиотики и химиотерапия. Россия, Москва: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство ОКИ», 2020. Vol. 65, № 5–6. P. 70–77.
12. Рыбальченко О.В. et al. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА: 6 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. Vol. 0, № 6. P. 3–10.
13. Muhammad M.H. et al. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches // *Front Microbiol.* 2020. Vol. 11. P. 928.
14. Guzmán-Soto I. et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models // *iScience.* 2021. Vol. 24, № 5. P. 102443.
15. Ma H., Bryers J.D. Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. Vol. 97, № 1. P. 317–328.
16. Sadiq F.A. et al. Phenotypic and genetic heterogeneity within biofilms with particular emphasis on persistence and antimicrobial tolerance // *Future Microbiol.* 2017. Vol. 12. P. 1087–1107.
17. Stewart P.S., Franklin M.J. Physiological heterogeneity in biofilms // *Nat Rev Microbiol.* 2008. Vol. 6, № 3. P. 199–210.
18. Majzoub M.E. et al. Genomic Evolution of the Marine Bacterium *Phaeobacter inhibens* during Biofilm Growth // *Appl Environ Microbiol.* Vol. 87, № 19. P. e00769-21.
19. Ikezaki S. et al. Mild Heat Stress Affects on the Cell Wall Structure in *Candida albicans* Biofilm // *Medical Mycology Journal.* The Japanese Society for Medical Mycology, 2019. Vol. 60, № 2. P. 29–37.
20. Cho T. et al. *In Vitro* Efficacy of Continuous Mild Heat Stress on the Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Biofilm Formation // *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2012. Vol. 35, № 8. P. 1371–1373.

21. Cottier F. et al. The Transcriptional Stress Response of *Candida albicans* to Weak Organic Acids // *G3* (Bethesda). 2015. Vol. 5, № 4. P. 497–505.
22. Gonçalves B. et al. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata* // *Biofouling*. 2020. Vol. 36, № 5. P. 621–630.
23. Sun Y. et al. pH Regulates White-Opaque Switching and Sexual Mating in *Candida albicans* // *Eukaryot Cell*. 2015. Vol. 14, № 11. P. 1127–1134.
24. Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans* // *Virulence*. 2012. Vol. 3, № 3. P. 251–261.
25. Parolin C. et al. Lactobacillus Biofilms Influence Anti-*Candida* Activity // *Front Microbiol*. 2021. Vol. 12. P. 750368.
26. Strus M. et al. The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against *Candida*. // *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005. Vol. 13, № 2. P. 69–75.
27. Vazquez-Munoz R. et al. Insights From the Lactobacillus johnsonii Genome Suggest the Production of Metabolites With Antibiofilm Activity Against the Pathobiont *Candida albicans* // *Front Microbiol*. 2022. Vol. 13. P. 853762.
28. Srivastava N. et al. *Lactobacillus plantarum* 108 Inhibits Streptococcus mutans and *Candida albicans* Mixed-Species Biofilm Formation // *Antibiotics* (Basel). 2020. Vol. 9, № 8. P. 478.
29. Krzyściak W. et al. Effect of a Lactobacillus Salivarius Probiotic on a Double-Species Streptococcus Mutans and *Candida albicans* Caries Biofilm // *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2017. Vol. 9, № 11.
30. Honorato L. et al. Extracellular Vesicles Regulate Biofilm Formation and Yeast-to-Hypha Differentiation in *Candida albicans* // *mBio*. Vol. 13, № 3. P. e00301-22.
31. De Angelis M., Gobbetti M. Lactobacillus SPP.: General Characteristics ☆ // *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2016.
32. Landete J.M. et al. Chapter 43 - Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains // *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* / ed. Preedy V.R., Watson R.R. San Diego: Academic Press, 2010. P. 387–396.
33. Salas-Jara M.J. et al. Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics // *Microorganisms*. 2016. Vol. 4, № 3. P. 35.
34. Aoudia N. et al. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and Lactobacillus fermentum: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties // *Food Microbiol*. 2016. Vol. 53, № Pt A. P. 51–59.
35. Silva S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance // *FEMS Microbiology Reviews*. 2012. Vol. 36, № 2. P. 288–305.
36. Jones T. et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. Vol. 101, № 19. P. 7329–7334.

37. Ene I.V., Bennett R.J., Anderson M.Z. Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans* // *Curr Opin Microbiol*. 2019. Vol. 52. P. 47–54.
38. Rosenberg S.M. Stress-Induced Loss of Heterozygosity in *Candida*: a Possible Missing Link in the Ability to Evolve // *mBio*. 2011. Vol. 2, № 5. P. e00200-11.
39. Ponde N.O. et al. *Candida albicans* Biofilms and Polymicrobial Interactions // *Crit Rev Microbiol*. 2021. Vol. 47, № 1. P. 91–111.
40. Lagree K., Mitchell A.P. Fungal Biofilms: Inside Out // *Microbiol Spectr*. 2017. Vol. 5, № 2. P. 10.1128/microbiolspec.FUNK-0024–2016.
41. Odds F.C., Odds F.C. *Candida* and candidosis. 2. ed. London: Baillière Tindall, 1988. 468 p.
42. Trofa D., Gácsér A., Nosanchuk J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen // *Clin Microbiol Rev*. 2008. Vol. 21, № 4. P. 606–625.
43. Tóth R. et al. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside // *Clin Microbiol Rev*. 2019. Vol. 32, № 2. P. e00111-18.
44. PubChem. Lactic Acid [Electronic resource]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/612> (accessed: 28.03.2023).
45. Zeise K.D., Woods R.J., Huffnagle G.B. Interplay between *Candida albicans* and Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Tract: Impact on Colonization Resistance, Microbial Carriage, Opportunistic Infection, and Host Immunity // *Clin Microbiol Rev*. Vol. 34, № 4. P. e00323-20.
46. Zangl I. et al. Human Pathogenic *Candida* Species Respond Distinctively to Lactic Acid Stress // *J Fungi (Basel)*. 2020. Vol. 6, № 4. P. 348.
47. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания - docs.cntd.ru [Electronic resource]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200038583> (accessed: 22.05.2023).
48. O’Toole G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay // *JoVE*. 2011. № 47. P. 2437.
49. da Silva Sabo S. et al. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria // *Food Res Int*. 2014. Vol. 64. P. 527–536.
50. Nettoor Veetil V., A V.C. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* using Response Surface Methodology // *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2022. Vol. 68, № 6. P. 105–110.
51. Chaillot J., Cook M.A., Sellam A. Novel determinants of cell size homeostasis in the opportunistic yeast *Candida albicans* // *Curr Genet*. 2023. Vol. 69, № 1. P. 67–75.

Благодарности

Автор также приносит благодарность СПбГУ за предоставленную возможность анализа электронно-микроскопических препаратов в Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» на сканирующем электронном микроскопе MIRA-3 (TESCAN) с использованием напылительной установки.