

Жанна Болеславовна КОСТЫРИНА<sup>1</sup>  
Марина Викторовна НИКОЛЕНКО<sup>2</sup>

УДК 579. 262

## СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

<sup>1</sup> ассистент кафедры  
Товароведения и технологии продуктов питания  
Тюменского государственного нефтегазового университета  
vot.76@mail.ru

<sup>2</sup> доктор биологических наук,  
доцент кафедры микробиологии  
Тюменского государственного медицинского университета  
nikolenko-marina@mail.ru

### Аннотация

Экспериментальные исследования относятся к области биологии, а именно к микробиологической лабораторной диагностике грибов. Изучение закономерностей возникновения и развития микробных сообществ (биопленок) является одним из ключевых моментов дальнейшего развития медицинской микробиологии. Авторами предложен для изучения пленкообразующей активности изолятов *Candida* sp. хронобиологический метод. В ходе исследования установлено, что колебания пленкообразования клинических изолятов грибов рода *Candida* подчиняются общим закономерностям существования биологических систем во времени и не зависят от вида микроорганизма. Выявлено, что циркадианный (околосуточный) период ритма с максимальными значениями пленкообразующей активности в утренние времена характерен для грибов, полученных от здоровых людей. Доказано, что ультрадианные гармоники (около 12-часовые) колебаний активности с максимальными значениями в утренние часы и ночное время свойственны для изолятов *Candida* sp., выделенных от больных кандидозом пациентов. Проведенные эксперименты позволяли выявить универсальные ритмометрические характеристики (вклад ритма и амплитудно — фазовая стабиль-

**Цитирование:** Костырина Ж. Б. Суточная динамика биопленкообразования грибов рода *Candida* / Ж. Б. Костырина, М. В. Николенко // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2016. Том 2. № 1. С. 70-77.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-1-70-77

ность), позволяющие с высокой достоверностью характеризовать состояние пациента (носительство, болезнь).

### Ключевые слова

Биопленки, вклад ритма, амплитудно-фазовая стабильность, грибы рода *Candida*.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-1-70-77

### Введение

Основная часть микроорганизмов в природных экотопах существует в виде ассоциаций, определяемых общим термином «биопленки». Согласно современным представлениям, биопленка — это непрерывный слой микробных клеток, прикрепленных к поверхности и друг к другу, расположенных на границе раздела фаз и заключенных в биополимерный матрикс [6].

Формирование подобных сообществ является одной из основных стратегий адаптации грибов к занимаемой экологической нише. В биопленке микроорганизмы приобретают защиту от различных физических (УФ излучение, высушивание), химических (изменение pH, антибиотики, биоциды, поверхностно-активные вещества), биологических антимикробных факторов (фагоциты, анти-тела, бактериофаги, факторы естественной резистентности макроорганизма) и получают возможность сохранения постоянства условий существования [2]. В ряде обзорных работ отражено значение биопленок для различных областей науки и практики, демонстрирующее возросший интерес к этой проблеме [4; 9]. В настоящее время способность микробов формировать пленки рассматривается как фактор их патогенности [10]. Однако, несмотря на широкий спектр работ в этом направлении и важность проблемы, до сих пор не найдено средств, которые могли бы специфически и полностью подавлять образование биопленок и уничтожать микроорганизмы внутри них. В данной работе авторами предложен новый хронобиологический подход к изучению пленкообразования на примере грибов рода *Candida*, так как биоритмы являются универсальным и важнейшим свойством жизни [1]. Биологические ритмы рассматриваются, как автономный процесс периодического чередования состояний клетки и колебаний интенсивности физиологических функций [2]. Поэтому, на наш взгляд, изучение биоритмов позволяет оценить резерв саморегуляции микроорганизма, определить стратегию распределения патогенных ресурсов во времени и открывает возможности управлять их жизнеспособностью и прогнозировать устойчивость к используемым средствам.

Цель работы — изучить суточную динамику пленкообразующей активности *Candida* sp.

### Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили 10 культур *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida krusei* (*C. krusei*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), выделенных из зева

при транзиторном *Candida*-носительстве, и 9 изолятов данных видов, полученных из мокроты больных кандидозом людей. Эти виды в организме человека входят в состав различных микросимбиоценозов и часто инициируют развитие оппортунистических инфекций, особенно у пациентов с иммунодефицитными состояниями [5].

Видовую идентификацию грибов проводили по комплексу признаков: изучению внешнего вида колоний, по хламидоспорообразованию, тесту на образование ростовых трубок, определению чувствительности дрожжевых организмов к антрафунгальным препаратам методом дисков, по ассимиляционной способности штамма [8]. Для работы использовали 24-часовую культуру, которая соответствовала начальному этапу фазы стационарного роста и покоя. Каждая временная точка включала 3 пробы. Исследования проводились в зимнее время года в течение суток с 4-х часовыми интервалами. Выбран суточный диапазон изучения функции, так как он позволяет быстро выявить ориентацию микроорганизмов во времени, изучить частоту колебаний, обеспечивающих адаптацию к различным условиям жизнедеятельности [7].

Пленкообразующую активность (БПО) изучали по способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного полистеролового стерильного планшета [14]. Количество инокулированных планктонных клеток подсчитывали на спектрофотометре iEMSReader MF (фирма «LabMethod», Финляндия), длина волны 540 нм, и выражали в единицах оптической плотности пленкообразования (ед БПО).

Статистическую обработку материалов и графическое изображение результатов проводили с использованием следующих программ: Primer of Biostatics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998, Microsoft Office Excel 2010. Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности,  $p<0,05$  [13]. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами  $T=12$  и  $T=24$  часа, мезор — среднее значение гармонической кривой косинусоиды, амплитуда ритма — расстояние от экстремума до мезора, и акрофаза — момент времени ожидаемого экстремума функции.

### **Результаты и их обсуждение**

У всех изучаемых культур выявлена суточная динамика пленкообразования. В спектральном составе биоритмов грибов, полученных от здоровых людей, установлены достоверные циркадианные (околосуточные) ритмы активности со стабильными положениями акрофаз в утренние часы ( $p<0,05$ ). Динамика активности формирования биопленок не зависела от вида возбудителя (рис. 1).

Многократно проведенные исследования дали идентичные результаты. Следовательно, выявленный тип ритмичности закономерен для грибов данных видов.

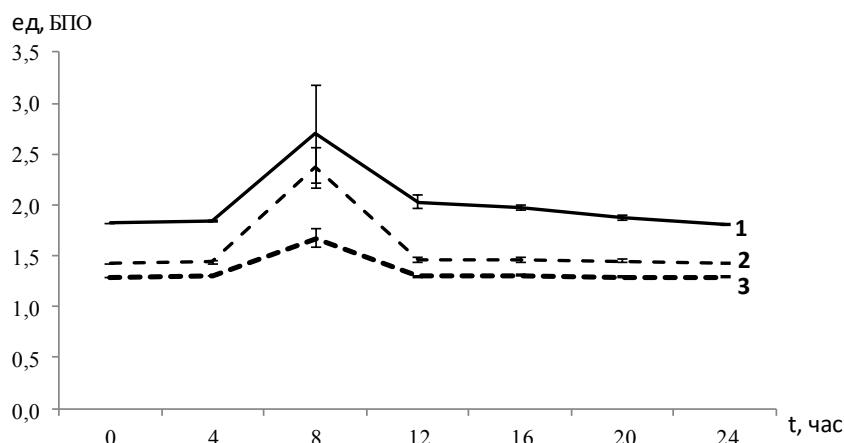


Рис. 1. Суточная динамика биопленкообразования изолятов грибов рода *Candida*, полученных из зева здоровых людей.

По оси абсцисс — время суток, часы; по оси ординат — БПО, ед.

1) *C. albicans*; 2) *C. krusei*; 3) *C. glabrata*.

У всех культур рода *Candida*, выделенных из клинического материала при кандидозе, выявлен ультрадианный (около 12-ти часовой) ритм изучаемой функции ( $p < 0,05$ ) с максимальными значениями показателя в утреннее и ночное время, а у клинических изолятов *C. glabrata* и *C. krusei* показатели амплитуды колебаний функции в 2,0-3,6 раза выше, чем у культур от здоровых людей. Установлено, что флюктуации пленкообразования клинических изолятов *Candida* sp. подчиняются общим закономерностям существования биологических систем во времени и не зависят от вида микроорганизма (рис. 2).

Таким образом, период ритма и амплитудно-фазовые закономерности являются универсальными показателями, которые подчеркивают различия грибов рода *Candida* здоровых людей от культур, полученных из организма больных острой кандидозной инфекцией. Появление околосуточных ритмов у микроорганизмов, с одной стороны, может быть обусловлено влиянием макроорганизма (для макроорганизма циркадианный ритм — ведущий и единственный генетически обусловленный в рассматриваемом нами спектральном диапазоне). С другой стороны, обсуждается вопрос о циркадианности в проявлении ряда физиологических функций грибов и формируется доказательная база, объясняющая наличие у них генетической регуляции биоритмов [3]. У клинических изолятов *Candida* sp., полученных от больных пациентов, ведущим ритмом пленкообразования являлся ультрадианный. К характерным свойствам таких ритмов относятся вариабельность периодов и способность к адаптивному ответу на периодические раздражители. Будучи нерегулярными, с внешне хаотически чередующимися периодами, ультрадианные ритмы устойчивы по набору

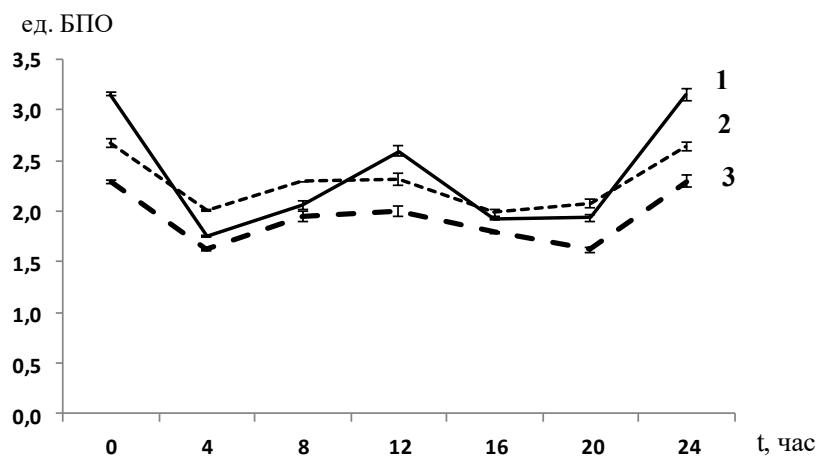


Рис. 2. Суточная динамика биопленкообразования изолятов рода *Candida*, полученных из зева больны кандидозом людей.

По оси абсцисс — время суток, часы; по оси ординат — БПО, ед.

1) *C. albicans*; 2) *C. krusei*; 3) *C. glabrata*.

своих колебаний [12]. Изучение изменений соотношения ультра- и циркадианых компонентов в спектральном составе, которое при различных воздействиях окружающей среды не является стационарным, дает возможность отличать патологические нарушения хроноинфраструктуры от приспособительных изменений [1]. Следовательно, подход к инфекции с позиции хронобиологии расширяет представление о физиологии грибов, а хронобиологический метод представляет интерес для дальнейшей разработки рациональных антимикробных мероприятий.

### Выводы

- Флуктуации пленкообразования клинических изолятов грибов рода *Candida* подчиняются общим закономерностям существования биологических систем во времени и не зависят от вида микроорганизма.
- Выявлены универсальные ритмометрические характеристики — вклад ритма и амплитудно-фазовая стабильность, позволяющие с высокой достоверностью характеризовать состояние пациента (носительство, болезнь).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арушанян Э. Б. Основы хронофармакологии / Арушанян Э. Б. М.: Ставрополь, 2000. 565 с.
- Губин Д. Г. Хроном сердечно-сосудистой системы на различных этапах онтогенеза человека / Д. Г. Губин, Г. Д. Губин. Тюмень, 2000. 176 с.

3. Загускин С. Л. Специфический для живой природы многочастотный параллельный резонансный захват и возможная его роль в аномальных явлениях / С. Л. Загускин, Н. Н. Федоренко // М-лы шестой Всероссийской науч.-практ. конф. по квантовой медицине. М., 2000. С. 74-80.
4. Ильина Т. С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Генетика. 2004. Т.40. № 11. С. 1445-1456.
5. Леуш С. С. Особенности клинического течения и лечения различных форм урогенитального кандидоза / С. С. Леуш, Г. Ф. Рошина, О. Ф. Полтавцева // Український журнал дерматології, венерології, косметології. 2003. № 2(9). С. 72-75.
6. Nikolaev Yu. A. Bioplenka – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю. А. Николаев, В. К. Плакунов // Микробиология. 2007. Т.76. № 2. С. 149-163.
7. Николенко М. В. Особенности временной организации биологических свойств изолятов *Candida species*: автореф. дис.... докт. биол. наук. Оренбург, 2013. 44 с.
8. Candida. Кандидозы. Лабораторная диагностика. / Н. П. Елинов, Н. В. Васильева, А. А. Степанова, Г. А. Чилина; под ред. проф. Н.П. Елинова. СПб.: Коста, 2010. 224 с.
9. Donlan R. M. Biofilms survival mechanisms of clinical relevant microorganisms / R. M. Donlan, W. Costerton // Clinical Microbiological Reviews. 2002. Vol. 15. Pp. 167-193.
10. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells / K. Lewis Current Topics in Microbiology and Immunology. 2008. Vol. 322. Pp. 107-131.
11. Lewis. K. Riddle of Biofilm Resistance / K. Lewis. // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. Vol. 45(4). Pp. 999-1007.
12. Lloyd A. Hypothesis: The central oscillator of the circadian clock is a controlled chaotic attractor / A. Lloyd, D. Lloyd // BioSystems. 1993. Vol. 29. Pp. 77-85.
13. Methods for cosinorrhythometry/ Nelson W., Tong Y. L., Lee J. K. et al. // Chronobiologia. 1979. Vol. 6. № 4. Pp. 305-323.
14. O' Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // Annual Review of Microbiology. 2000. № 54. Pp. 49-79.

**Zhanna B. KOSTYRINA<sup>1</sup>**  
**Marina V. NIKOLENKO<sup>2</sup>**

## CIRCADIAN DYNAMICS OF CANDIDA FUNGI BIOFILM FORMATION

<sup>1</sup> Assistant,  
Department of Commodity Merchandising and Food Technology  
Tyumen State Oil and Gas University  
vot.76@mail.ru

<sup>2</sup> Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor,  
Department of Microbiology  
Tyumen State Medical University  
nikolenko-marina@mail.ru

### Abstract

Experimental research refers to the field of biology, namely, the microbiological laboratory diagnostics of fungi. The study of the microbial communities (biofilms) genesis and the development peculiarities is one of the crucial stages in the further medical microbiology development. The authors suggest a chronobiological research technique to study the biofilm-formation activity of *Candida* species isolates. The research has revealed that the amplitude variations of the film-formation among the *Candida* species clinic isolates occur in accordance with the general regularities of biosystems existence in the course of time and are not contingent on the type of the microorganism. It has been discovered that the circadian rhythm period with the maximum indicator value of the film-forming activity in the morning hours is typical for the fungi, obtained from healthy *Candida* carriers. It has been proved that the ultradian harmonics of the activity oscillation (approximately 12 hours long) with the maximum indicator value in the morning hours (from 10.50 am to 12.30 pm) and night time are typical for the *Candida* species isolates, obtained from the people infected with Candidiasis. The conducted experiments made it possible to identify the universal rhythmometrical characteristics (including the input of the rhythm and gain-phase stability), enabling us to characterize the patient's condition (carriage, disease) with high and more precise confidence.

### Keywords

Biofilms, rhythm contribution, amplitude-phase stability, *Candida* fungi.

---

**Citation:** Kostyrina, Zh. B., and M. V. Nikolenko. 2016. "Circadian Dynamics of *Candida* Fungi Biofilm Formation". Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 2, no. 1, pp. 70-77. DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-1-70-77

---

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-1-70-77

## REFERENCES

1. Aroushanian, E. B. 2000. Osnovy hronofarmakologii [Foundations of Chronopharmacology]. Moscow: Sevastopol.
2. Donlan, R.M., and W. Costerton. 2002. "Biofilms Survival Mechanisms of Clinical Relevant Microorganisms". *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, pp. 167-193.
3. Gubin, D. G., and G. D. Gubin. 2000. Hronom serdechno-sosudistoy sistemy na razlichnyh etapah ontogeneza cheloveka [Chronometry of the Cardio-Vascular System at Different Stages of the Human Ontogeny]. Tyumen.
4. Ilyina T. S., Yu. M. Romanova, and A. L. Gintsburg. 2004. "Bioplenki kak sposob suschestvovaniya bakteriy v okruzhayuscheny srede i organizme hozyaina: fenomen, geneticheskiy kontrol i sistemy reguljatsii ih razvitiya" [Biofilm as a Means of Bacteria Existence in the Environment and the Host Organism: Phenomenon, Genetic Control and the Regulation Systems of their Development]. *Genetika* [Genetics], vol. 40, no. 11, pp. 1445-1456.
5. Leush, S. S., G. F. Roschina, and O. F. Poltavtseva. 2003. "Osobennosti klinicheskogo techeniya i lecheniya razlichnyh form urogenitalnogo kandidoza" [The Peculiarities of the Clinical Course and Treatment of Different Forms of Urinogenital Candidiasis]. *Ukraïnskiy zhurnal dermatologii, venerologii, kosmetologii* [Ukrainian Magazine of Dermatology, Venereology, Cosmetology], no. 2(9), pp. 72-75.
6. Lewis, K. 2001. "Riddle of Biofilm Resistance". *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45(4), pp. 999-1007.
7. Lewis, K. 2008. "Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells". *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 322, pp. 107-131.
8. Lloyd, A., and D. Lloyd. 1993. "Hypothesis: The central oscillator of the circadian clock is a controlled chaotic attractor". *Bio Systems*, vol. 29, pp. 77-85.
9. Nelson W., Y. L. Tong, J. K. Lee, et al. 1979. "Methods for Cosinorrhythometry". *Chronobiologia*, vol. 6, no. 4, pp. 305-323.
10. Nikolaev, Yu. A., and V. K. Plakunov. 2007. "Bioplenka — 'gorod mikrobov' ili analog mnogokletchnogo organizma?" [Biofilm — "the City of Germs" or the Analogy of Multicellular Organism?]. *Mikrobiologiya* [Microbiology], vol. 76, no. 2, pp. 149-163.
11. Nikolenko, M. V. 2013. "Osobennosti vremennoy organizatsii biologicheskikh svoystv izolyatov *Candida species*" [Features of Temporal Organization of Biological Properties of *Candida Species* Isolates]. Dr. Sci. (Biol.) diss. abstr., Tyumen State Medical Academy.
12. O' Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. "Biofilm Formation as Microbial Development". *Annual Review of Microbiology*, no. 54, pp. 49-79.
13. Yelinov, N. P., N. V. Vasilieva, A. A. Stepanova, and G. A. Chilina. 2010. *Candida. Kandidozy. Laboratornaya diagnostika* [Candida. Candidiasis. Laboratory diagnostics]. Edited by N. P. Yelinov. Saint Petersburg: Kosta.
14. Zagouskin, S. L., and N. N. Fedorenko. 2000. "Spetsificheskiy dlya zhivoy prirody mnogochastotnyy parallelnyy rezonansnyy zahvat i vozmozhnaya ego rol v anomalnyh yavleniyah" [Specific to Wildlife Multifrequent Parallel Resonance Capture and its Possible Role in Abnormalities]. M-ly shestoy Vserossiyskoy nauch.-prakt. konf. po kvantovoy meditsine [Proceedings of the Sixth All-Russian Scientific-Practical Conference on Quantum Medicine], pp. 74-80. Moscow.