

УДК 616-002.3:579.8

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ БИОПЛЕНОК, ФОРМИРУЕМЫХ ШТАММАМИ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ГРАМНЕГАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ

В.Б. Туркутюков¹, Т.Д. Ибрагимова¹, Д.В. Фомин²

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, Владивосток, пр-т Острякова, 2),

²Институт биологии моря ДВО РАН (690041, Владивосток, Пальчевского, 17)

Ключевые слова: *quorum sensing*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, электронная микроскопия.

Проанализированы материалы публикаций о роли биопленок в инфекционной патологии. Рассмотрены вопросы структуры биопленок бактерий на биологических объектах, изделиях медицинского назначения. Представлены материалы изучения сканирующей электронной микроскопии биопленок, формируемых неферментирующими грамотрицательными бактериями *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* при гнойно-септических осложнениях у пациентов с ожоговой травмой. Рассмотрены вопросы особенностей структуры и функций биопленок *in vivo*, взаимосвязи между механизмом их образования и течением инфекционного процесса.

Молекулярные механизмы формирования и в дальнейшем хронизации гнойно-воспалительных процессов являются объектом активного внимания исследователей – в свете понимания того, что большинство природных популяций бактерий существует в прикрепленном состоянии, в котором они способны эффективно обмениваться сигналами и проявлять координированную активность подобно тканям многоклеточных организмов. Возникновение сообществ в виде пленочной структуры является одной из основных способов выживания бактерий в микробиоценозе. Так, по данным Центра контроля заболеваний США (CDC, USA), около 65% всех инфекций обусловлено формированием в макроорганизме биопленок [20].

Бактерии, интегрированные в биопленках, защищены от агрессивных факторов внешней среды и антибактериальных препаратов, в особенности в организме хозяина при возникновении инфекции. В настоящее время под биологической пленкой понимают множественные слои бактериальных клеток, прикрепленных к поверхности раздела фаз и друг к другу и покрытых биополимерным матриксом. Коммуникационные взаимодействия в биопленке осуществляются в том числе при участии генетически детерминированного регуляторного механизма, называемого «чувством кворума» (*Quorum Sensing*, QS) [1, 3, 32]. Проблеме регуляции бактериальной активности с помощью системы QS посвящено много обзоров, поскольку в последнее время механизмы функционирования микробного сообщества, к которому относится биопленка, привлекают все большее внимание исследователей. Микроорганизмы образуют биопленки на любых биотических и абиотических поверхностях, что создает большие проблемы в медицинской практике. Биопленки, как это сейчас

установлено, являются одним из патогенетических факторов хронических инфекционных процессов в макроорганизме [18, 19, 29]. В первую очередь это касается инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в особенности при использовании различных имплантатов (катетеров, протезов, фиксирующих устройств, искусственных клапанов сердца) [7, 9].

В процессе формирования биопленки на первом этапе принимают участие поверхностные структуры бактерий: выросты клеточной поверхности, жгутики и пили, обеспечивают подвижность возбудителей, важную для формирования биопленки, так как микроорганизмы, имеющие дефекты механизмов подвижности, неспособны к формированию подобных структур [5, 33]. Большинство приспособлений и органелл движения принимают участие и в процессе адгезии бактерий [24], обеспечивая начальные процессы в образовании биопленки – фиксацию к поверхности клеток живого организма или имплантатов [2, 6, 18, 35].

Формирование сообщества микроорганизмов в виде биопленки в последующем завершается образованием экзополимерного матрикса – продукта жизнедеятельности самих клеток, основного структурного компонента биопленки, покрывающего ее поверхность и обеспечивающего защиту от неблагоприятных воздействий. Экзополисахариды составляют значительную часть экзополимерного матрикса – 85% массы биопленки. Таким образом, бактерии в биопленке заключены в полимерный матрикс, свойства которого определяют взаимоотношения внутри клеточного сообщества и с внешней средой [21].

Устойчивость биопленок к внешним воздействиям во многом обусловлена физиолого-биохимическими свойствами входящих в их состав микроорганизмов, которые фенотипически отличаются от тех же микроорганизмов, существующих в виде планктонных популяций [16, 19]. В последнее десятилетие достигнуты значительные успехи в исследовании параметров этого специфического фенотипа как физиолого-биохимическими, так и молекулярно-биологическими методами [17, 34].

В настоящее время изучение биопленок развивается в нескольких направлениях. Одно из них – микроскопические исследования, проводимые *in situ*, которые способствуют выработке целостного представления о строении данной структуры. При этом следует учитывать, что в биопленке все компоненты бактериального сообщества тесно связаны и с трудом поддаются

разделению для дальнейшего анализа другими методами. Применение микроскопических техник обеспечило успехи в анализе структурно-функциональных характеристик биопленок, в том числе клеточных структур, участвующих в их образовании [15, 25, 39].

В нашем исследовании подготовка колоний штаммов *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также клинического материала к высушиванию проводилась по методике Y.H. Samaranyake et al. (2005). Перед микроскопией препараты высушивались под давлением от 50 до 70 бар (40–60 атм) в CO₂ с переходом CO₂ из жидкой фазы в газ на установке Critical point dryer (марка CPD 030, Германия, BAL-TEC). Напыление хромом выполняли на установке AUTO 306 (Великобритания, Edwards). Сканирующую электронную микроскопию проводили на микроскопе Leo 430 (Великобритания, Leo). Режим съемки: ускоряющее напряжение 30 кВ, уровень вакуума 2×10^{-5} торр (мм рт.ст.), увеличение 1 500, 3 000 и 10 000 раз, детектор вторичных электронов SE1 (основной режим). Фиксирование и обработка изображений на микроскопе осуществлялись встроенной фирменной программой LEO UIF.

Электронно-микроскопическое изучение биопленок при культивировании бактерий в искусственных и естественных условиях выявило некоторые особенности их строения. Так, на начальных этапах формирования биопленок в искусственных условиях морфология микроорганизмов не изменялась (рис. 1). Однако в дальнейшем бактериальные клетки подвергаются структурным изменениям, связанным с прикрепленным состоянием, особенностями функциональной активности, обусловленной коллективным сосуществованием, в результате чего в бактериальном сообществе появлялись клетки, отличающиеся по морфологии от свободно живущих (рис. 2).

У прикрепленных бактерий наблюдалась замена поверхностных структур, свойственных планктонным клеткам, другими, нужными для прикрепления к поверхности. В биопленках проходят очень важные процессы генетической трансформации. Многие авторы свидетельствуют, что частота обмена генетическим материалом в биопленках по сравнению с планктонными культурами увеличивается в десятки раз [23, 37, 40].

Необходимость особой плотной упаковки клеток в биопленке сопровождается изменением их формы и ультраструктурной организации. В связи с этим возникают определенные трудности при интерпретации данных микроскопии. Дальнейшие исследования биопленочных сообществ будут способствовать пониманию особенностей их организации. Так, отмечалось, что мультивидовые биопленки оказываются более стабильными, чем биопленки, построенные из микроорганизмов одного вида, что обусловлено часто устанавливающимися синергидными взаимоотношениями [15, 26].

В нашем исследовании у пациентов с ожоговой травмой причиной развития гнойно-септических осложнений в 45% случаев являлась микст-инфекция, где доминирующее место занимали *P. aeruginosa* и *A. baumannii* (рис. 3). Формируемые данными видами

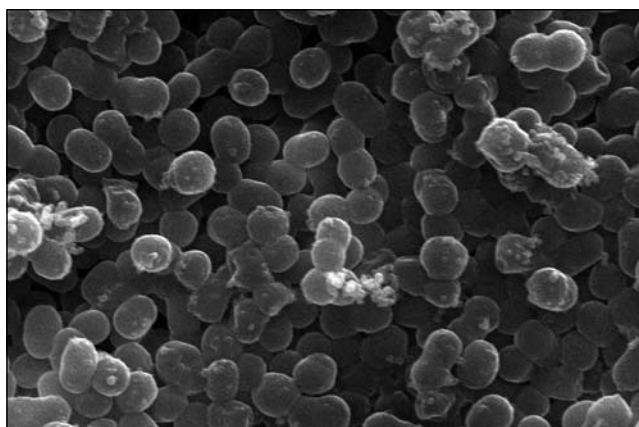


Рис. 1. Монокультура штамма *A. baumannii* (9 часов).
Электроннограмма, $\times 10\,000$.

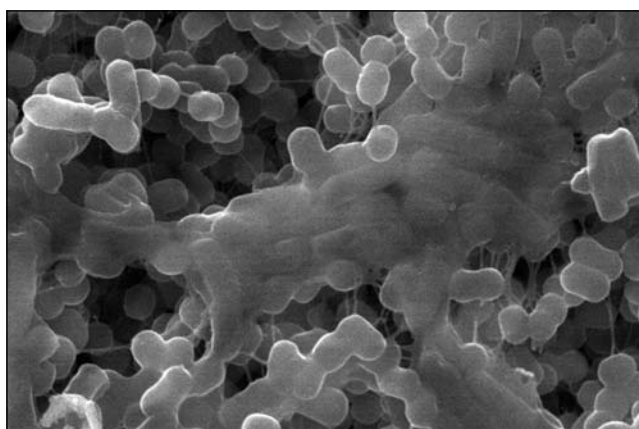


Рис. 2. Монокультура штамма *A. baumannii* (18 часов).
Электроннограмма, $\times 10\,000$.

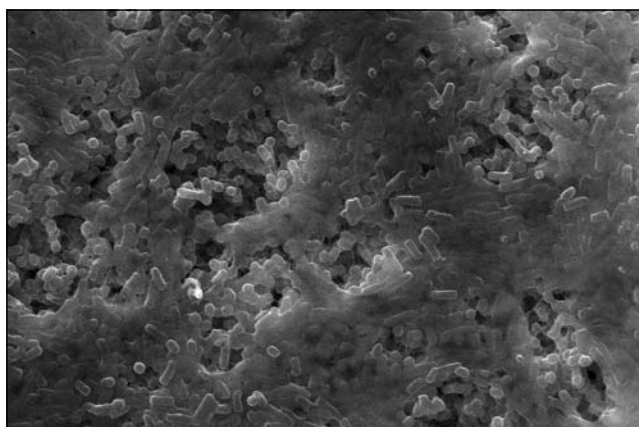


Рис. 3. Биопленка *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, выделенная у больного с ожоговой травмой. Электроннограмма, $\times 3\,000$.

плечные структуры инициировали более длительный инфекционный процесс, утяжеляя течение основного заболевания.

Принципиально важные результаты для обоснования данного положения получены в работе S.B. Lurpens et al. [27], где показано, что непатогенная бактерия *Veillonella parvula* при совместном выращивании в составе бинарных биопленок с патогенным *Streptococcus mutans* изменяла метаболизм последнего таким образом, что он становился более устойчивым к различным антибактериальным агентам. Хотя механизм

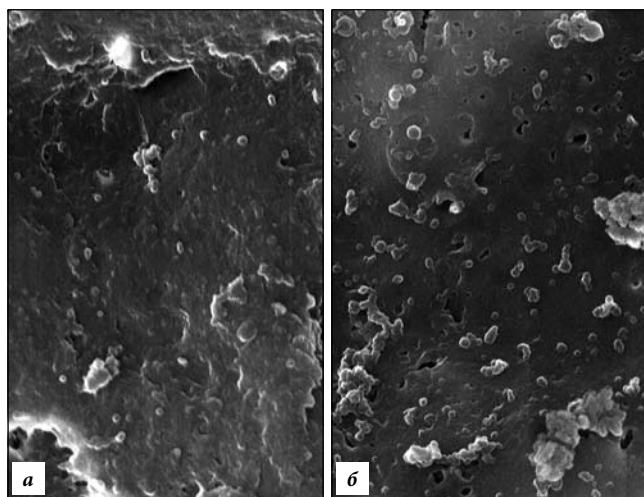


Рис. 4. Биопленка на ожоговой поверхности, сформированная штаммом *A. baumannii* (а) и штаммами *P. aeruginosa* и *A. baumannii* (б). Электронограмма, $\times 3000$.

этого феномена остается неизвестным, авторы пришли к важному выводу о необходимости подбора химиотерапевтических средств, активных не только против индивидуального патогена, но и против других представителей микробного сообщества.

Таким образом, можно предположить, что утяжеление течения заболевания часто обуславливается недооценкой роли участников микробного сообщества в развитии осложнений при гнойно-септических инфекциях. В этих условиях проведение мононаправленной антибактериальной химиотерапии не оправданно. Только комплексная оценка этиологической структуры воспалительного процесса может обеспечить эффективность и качество оказания медицинской помощи.

В литературе пока недостаточно освещается вопрос о покоящихся и некультивируемых формах бактерий, обнаруживаемых в составе биопленок. Их образование и существование в составе микробного сообщества, защищенного от внешних воздействий, важно для сохранения вида в ряду поколений и выживания микроорганизмов в изменяющихся и экстремальных условиях внешней среды [37]. На рис. 4 представлена электронограмма биопленки, сформированной штаммом *A. baumannii*, снятой с ожоговой поверхности. Отчетливо видны процессы почкования планктонных клеток на поверхности пленки и выход их из биопленочного сообщества.

Бактерии, интегрированные в биопленку на стадии ее зрелости, начинают подвергаться естественным («запланированным») стрессовым воздействиям. В результате в составе биопленок, помимо активно метаболизирующих клеток, обнаруживаются покоящиеся и некультивируемые формы [8, 11, 38].

Действительно, клетки, находящиеся в разном физиологическом состоянии, могут запускать механизм адаптивного мутагенеза, дополняемый обменом продуктами метаболизма и горизонтальным переносом генетической информации, что активизирует микроэволюционные процессы, в том числе реализацию

механизмов устойчивости к антибиотикам [10, 25, 39]. При этом большая часть клеток сохраняется в составе биопленки, обеспечивая феномен персистентности [4, 12, 28, 31]. Феномен персистентности следует отличать от другого генетически ненаследуемого феномена – «нейтральности», проявляющегося во всей популяции микроорганизмов и обусловленного тем, что медленно растущие (или покоящиеся) клетки, как правило, обладают сниженной чувствительностью к антибактериальным агентам [12, 20].

В этих условиях лечение антибиотиками уничтожает в макроорганизме подавляющее большинство свободноживущих (планктонных) клеток патогена, а также значительную часть чувствительных микроорганизмов в биопленках. Иммунная система расправляется с остатком планктонных клеток-персистеров. Однако клетки-персистеры, локализованные в биопленках, оказываются недоступными для иммунной системы и после прекращения антибиотикотерапии возобновляют размножение, вызывая повторную вспышку инфекционного процесса. Кроме того, биопленки образуются практически на всех внедряемых в макроорганизм медицинских устройствах: катетерах, протезах и т.д. Поэтому понятна важность проблемы персистентности микроорганизмов для медицины.

Несмотря на усилия, прилагаемые для разработки мер борьбы с устойчивостью биопленок к различным воздействиям, механизмы этой устойчивости и, в особенности, механизмы, обеспечивающие формирование клеток-персистеров, во многом остаются дискуссионными [22, 29, 30, 36].

Существует несколько альтернативных (а также дополняющих друг друга) точек зрения на механизмы, с помощью которых возникают клетки-персистеры. При оценке гипотез, посвященных их формированию, необходимо учитывать следующие свойства этих микроорганизмов. Во-первых, культуры, выращенные из этих клеток, обладают такой же чувствительностью к антибиотикам, как и родительские, из которых они были получены. Во-вторых, клетки-персистеры составляют лишь незначительную часть общей популяции (10^{-6} или менее), но их количество возрастает в стационарной фазе роста. Таким образом, первоначальная идея о том, что персистенция связана с состоянием покоя, сохранила свое значение. Клетки-персистеры второго вида возникают в процессе роста популяции. Их доля зависит от числа клеток в культуре, но не зависит от размера инокулята. Популяция клеток дикого типа содержит, кроме нормальных (чувствительных к антибиотикам), также оба из перечисленных видов персистеров [13, 14].

Формирование биопленок в настоящее время рассматривается как важнейший этап патогенеза практически любого инфекционного процесса [3]. Такая форма существования микроорганизмов является главным звеном механизма самосохранения бактерий в окружающей среде и обусловлена их генетической пластичностью, которая позволяет выживать в неблагоприятных условиях и заселять различные биотопы

живой и неживой природы. Важнейшей особенностью бактериальных пленок является возможность защиты клеток-персистеров, обладающих выраженной антибиотикорезистентностью и высокой вирулентностью, не чувствительных к дезинфектантам, а при развитии микст-инфекции – обеспечивающих процессы генетического обмена между бактериями.

Литература

1. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. "Quorum sensing", или социальное поведение бактерий // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 2003. № 5. С. 86–93.
2. Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. М.: Изд-во МГУ, 1973. 126 с.
3. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 149–163.
4. Плакунов В.К. Дифференциальная чувствительность синтеза бактериальных белков к антибиотикам // Антибиотики. 1971. № 6. С. 766.
5. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А. и др. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 2006. № 4. С. 38–42.
6. Северина Л.О. Бактериальные S-слои // Микробиология. 1995. Т. 64. № 6. С. 725–733.
7. Сидоренко С.В. Роль бактериальных биопленок в патологии человека // Инф. хир. 2004, № 2 (3). С. 16–20.
8. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р. и др. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. 2010. Т. 79, № 4. С. 432–446.
9. Туркутюков В.Б., Слабенко Э.В., Фомин А.К. Особенности формирования биологических пленок штаммами *P. aeruginosa* при внутрибольничных пневмониях // Дальневосточный медицинский журнал. 2008, № 1. С. 59–61.
10. Туркутюков В.Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам // Тихоокеанский медицинский журнал, 2011, № 2. С. 28–31.
11. Эль Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А. и др. Адаптивные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75, № 4. С. 446–456.
12. Aridesi J.N., Zahller E., Roe F., et al. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin // Antimicrob. Agents Chemother. 2003. Vol. 47. P. 1251–1256.
13. Banas J.A., Miller J.D., Fuschino M.E. et al. Evidence that accumulation of mutants in a biofilm reflects natural selection rather than stress-induced adaptive mutation // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73. P. 357–361.
14. Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Bacterial persistence as a phenotypic switch // Science. 2004. Vol. 305. P. 1622–1625.
15. Burmolle M., Webb J.S., Rao D. et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72. P. 3916–3923.
16. Costerton J.W., Lappin-Scott H.M. Introduction to microbial biofilms // Microbial biofilms / Eds. H.M. Lappin-Scott, J.W. Costerton. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. P. 1–11.
17. Costerton J.W. The Biofilm Primer // Springer Series on Biofilms / Ed. Eckey C. Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. 197 p.
18. Dunne M.W. Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately? // Clin. Microbiol. Rev. 2002. Vol. 15. P. 155–166.
19. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. 2002. Vol. 15. P. 167–193.
20. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // Nat. Rev. Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 95–108.
21. Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // J. Bacteriol. 2001. Vol. 138. P. 5395–5401.
22. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon // J. Biosci. 2008. Vol. 33. P. 795–805.
23. Jefferson K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 236. P. 163–173.
24. Jiron A.G., Torres A.G., Freer E., et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells // Mol. Microbiol. 2002. Vol. 44. P. 361–379.
25. Krasovec R., Jerman I. Bacterial multicellularity as a possible source of antibiotic resistance // Med. Hypotheses. 2003. Vol. 60. P. 484–488.
26. Kreft J.U. Biofilm promote altruism // Microbiol. 2004. Vol. 150. P. 2751–2760.
27. Luppens S.B., Kara D., Bandounas L. et al. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm // Oral Microbiol. Immunol. 2008. Vol. 23. P. 183–189.
28. Levin B.R., Rozen D.E. Noninherited antibiotic resistance // Nat. Rev. Microbiol. 2006. Vol. 4. P. 556–562.
29. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // Nat. Rev. Microbiol. 2007. Vol. 5. P. 48–56.
30. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells // Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology / Ed. Romeo T. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. 322 p.
31. McDermott W. Microbial persistence // Yale J. Biol. Med. 1958. Vol. 30. P. 257–291.
32. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria // Ann. Rev. Microbiol. 2001. Vol. 55. P. 165–199.
33. O'Toole G.A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 30. P. 295–304.
34. Palmer R.J., Jr., Stoodley P. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases // J. Bacteriol. 2007. Vol. 189. P. 7948–7960.
35. Prigent-Combaret C., Vidal O. et al. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 5993–6002.
36. Sharma A.M., Yadav S. Biofilms: microbes and disease // Brazilian J. Infectious Diseases. 2008. Vol. 12. P. 526–530.
37. Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley S., et al. Growth and detachment of cell cluster from mature mixed-species biofilm // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67. P. 5608–5613.
38. Wijman J.G.E., de Leeuw P.P.L., Moezelaar R. et al. Air-liquid interface biofilm of *Bacillus cereus*: formation, sporulation and dispersion // J. Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73. P. 1481–1488.
39. Woo P.C., To A.P., Lau S.K. et al. Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic-induced cell wall deficient bacteria // Med. Hypotheses. 2003. Vol. 61. P. 503–508.
40. Van Elsland J.D., Bailey M.J. The ecology of transfer of mobile genetic elements // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. Vol. 42. P. 183–197.

Поступила в редакцию 17.07.2013.

MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF BIOFILMS DEVELOPED BY GRAM-NEGATIVE NON-FERMENTABLE BACTERIAL STRAINS

V.B. Turkutyukov¹, T.D. Ibragimova¹, D.V. Fomin¹

¹ Pacific State Medical University (2 Ostyakov Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² Institute of Marine Biology, FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation)

Summary – The paper analyses literature data about the role of biofilms in the infectious diseases pathology, discusses issues of the structure of bacterial biofilms in biological objects and medicinal products, and provides information on the studying of scanning electron microscopy of biofilms developed by gram-negative non-fermentable bacteria *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in case of suppurative-septic complications in patients with burn injury. Special regard is given to the features of biofilms structure and functions in vivo, and relationship between the development mechanism and the course of the infectious process.

Key words: quorum sensing, *Acinetobacter baumannii*,

Pseudomonas aeruginosa, scanning electron microscopy.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 4, p. 44–47.