

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 1

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2014

УДК -6126 232+616.-3-008

О.В. Рыбальченко¹, В.М. Бондаренко², О.Г. Орлова¹

УЛЬТРАСТРУКТУРА БИОПЛЕНОК ПРИ ВНУТРИВИДОВОМ И МЕЖВИДОВОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,

² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Увеличение численности отдельных видов условно патогенных микроорганизмов (УПМ) приводит к их доминированию среди представителей нормальной микрофлоры, что часто способствует развитию патологического процесса в организме человека. Фактором, инициирующим приоритетное развитие УПМ, является активное формирование ими микробных сообществ, в том числе биопленок. На электронно-микроскопическом уровне (трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия) выявлена сложная ультра-тонкая организация микробных сообществ различных бактериальных и дрожжевых биопленок. Обнаружены особенности ультраструктуры микроорганизмов во внутривидовых и межвидовых сообществах. Во всех исследованных микробных сообществах показано наличие поверхностной пленки и полисахаридного матрикса, способствующих развитию повышенной устойчивости микробных популяций в составе биопленок к действию антибиотиков. Анализ альтернативного способа антимикробного воздействия, путем совместного выращивания УПМ с бактериоциногенными пробиотическими культурами, выявил патологические ультраструктурные изменения УПМ как на клеточном, так и популяционном уровнях. Полученные данные свидетельствуют о разнохарактерном ответе бактериальных клеток, содержащихся в биопленках при симбиотических или антагонистических взаимоотношениях, отражающих особое социальное поведение микроорганизмов, регулируемое Quorum Sensing (QS)-системой.

Ключевые слова: бактериальная биопленка, микроорганизмы, ультраструктура, симбиотические и антагонистические взаимоотношения

O.V. Rybalchenko¹, V.M. Bondarenko², O.G. Orlova¹

ULTRASTRUCTURE FEATURES IN BIOFILMS DURING OPPORTUNISTIC BACTERIA INTRASPECIFIC AND INTERSPECIFIC INTERACTIONS

¹ St. Petersburg State University, Sankt-Petersburg, Russia

² Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Opportunistic microorganisms are typically non-pathogenic microorganisms that began dormant as a pathogen by increasing its number and develop opportunistic infections. The biofilm (microbial communities) forming capacity is the major etiologic agent of opportunistic infections. Microscopic examination of biofilms by scanning and transmission electron microscopy revealed a composite ultrastructure organization of different bacterial and yeast microbial communities. The obtained data characterize the specific composition and ultrastructure features of microbial cells during its intraspecific and interspecific interactions in biofilms. All types of biofilms were characterized by surface films and polysaccharide matrix that increased stability of microbial population in the biofilm to antibiotics. The alternative method of antimicrobial therapy effect, by co-cultivating of opportunistic microorganisms with probiotic cultures,

demonstrated ultrastructural pathological changes in opportunistic bacteria at the cellular and population levels. Biofilms contained either symbiotic or antagonistic bacterial cells reflects social behaviors of microorganisms cooperated by Quorum Sensing (QS) system.

Key words: bacterial biofilms, ultrastructure, microorganisms, symbiotic and antagonistic interactions

Введение.

При хронических воспалительных процессах, а также при дисбактериозе кишечника, условно патогенные микроорганизмы (УПМ), колонизируя слизистые оболочки тонкой кишки, могут формировать биопленки – микробные сообщества, способные наподобие бактериального газона выстилать поверхность слизистых оболочек кишечника [1, 9, 16]. В настоящее время межклеточные коммуникации у микроорганизмов являются пристальным объектом исследования и одним из наиболее приоритетных направлений развития микробиологии [5, 6, 8, 9]. Детально изучена структура, функции и генетический контроль бактериальных биопленок *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* [7, 8]. В исследованиях *in vitro* проведен сравнительный анализ образования биопленок клетками 330 штаммов *Escherichia coli*, в том числе 104, изолированных от здоровых носителей, 68 – от детей с острой кишечной инфекцией, 90 – с явлениями бактериемии и 68 – от мужчин с инфекцией мочевыводящих путей. Авторам удалось выявить зависимость процесса образования биопленок от состава питательной среды и наличия у бактерий различных поверхностных структур: агрегативных и конъюгативных F-подобных пилей. Стимулировать образование биопленок на поверхности твердых субстратов могли также полисахаридные капсулы и поверхностные полисахариды бактериальной клеточной стенки [19]. После завершения адгезии бактерии начинали активно выделять экзополисахариды, заполняющие межклеточное пространство, что способствовало защите микробных клеток от высыхания и обеспечивало устойчивость к действию повреждающих физико-химических факторов [18].

При выраженном дисбиозе кишечника возможно развитие хронического воспаления, маркерами которого являются наличие в очаге макрофагов и лимфоцитов, пролиферация соединительной ткани, накопление матриксных протеинов и усиление ангиогенеза [15, 16]. При язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, болезни Крона, миокардитах, бронхиальной астме, диабете 2 типа, липидном дистресс-синдроме, ожирении, атеросклерозе

и других соматических заболеваниях определенную роль играют условно патогенные микроорганизмы [3,4,13,14]. Торпидное, неподдающееся базисной терапии течение воспалительного процесса связывают с образованием возбудителями данных заболеваний микробных биопленок, контролируемых QS-системой [1, 8, 15, 16, 17].

В мукозном (пристеночном) слое слизистой оболочки кишечника в составе биопленок микробные клетки располагаются на достаточно близком расстоянии друг от друга, что обеспечивает им, в первую очередь, контакты для быстрого обмена продуктами метаболизма и, в конечном итоге, целостность структуры всего сообщества. Описано образование условно патогенными бактериями смешанной (полимикробной) биопленки [7].

Целью настоящей работы являлось исследование ультраструктуры однородных и смешанных микробных сообществ условно патогенных бактерий и грибов рода *Candida* при формировании биопленок на поверхности плотных питательных сред.

Материалы и методы

Объектами исследования служили штаммы *Escherichia coli* B, *Enterococcus faecalis* 254, *Staphylococcus aureus* 209, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Candida albicans* 624, а также клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa* PA-8 и *Burkholderia cepacia* BC-3 из музея культур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва).

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Особенность подготовки препаратов для проведения электронно-микроскопического анализа методом ультратонких срезов заключалась в сохранении исходной структуры и пространственного расположения микробных клеток в исследуемой биопленке. Для этого участки бактериального роста, вырезанные вместе с агаром, предварительно фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на буфере Хенкса (pH=7,2) при температуре 4°C, наливая фиксатор в основание агаровой пластинки, чтобы не нарушить целостность и поверхностные структуры микробных сообществ. Через 24 ч на поверхность фиксированных образцов наносили несколько капель 0,5%-ного раствора агарозы, расплавленной на водяной бане и охлажденной до 30°C. Заключенные в агарозный гель пробы промывали дистиллированной водой и подвергали вторичной

фиксации в 1%-ном водном растворе четырехоксида осмия в течение суток при температуре 4°C, полностью помещая их в раствор фиксатора. Для обезвоживания образцы целиком погружали в растворы спиртов возрастающей концентрации по стандартной методике и заключали в смолу. Для устранения ошибок из заливочных блоков делали заготовки в виде пирамидок на пирамитоме (ЛКВ, Швеция), что обеспечивало возможность правильно ориентировать исследуемый объект и оценивать местоположение зон бактериального роста относительно друг друга при дальнейшем изготовлении ультратонких срезов. Окраску ультратонких срезов, полученных из зон бактериального роста культур, проводили по общепринятому методу. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100С (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). При получении препаратов биопленки фиксировали в парах 25%-ного раствора глутаральдегида на буфере Хенкса в течение 12 ч при температуре 4°C. Затем биопленки подвергали обезвоживанию в серии спиртов возрастающей концентрации, в смеси 96% этилового спирта с ацетоном и в ацетоне. Обезвоженные препараты помещали на покровное стекло, которое приклеивали электропроводным клеем к держателям, высушивали на воздухе при комнатной температуре и напыляли золотом в вакуумной установке JFC-1100 (JEOL, Япония). Готовые препараты просматривали в сканирующем электронном микроскопе JSM-35С (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Результаты

Электронно-микроскопическое исследование биопленок УПМ методами ТЭМ и СЭМ выявило сложную ультратонкую организацию микробных сообществ данного типа, одним из основных компонентов которой является комплекс защитных структур. На ультратонких срезах видно, что биопленки однородных и смешанных микробных сообществ *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *C. freundii*, *P.aeruginosa*, *B.ceracia* и дрожжей рода *Candida*, выращенных на соответствующих плотных средах, со стороны воздуха защищены комплексом оригинальных поверхностных структур, объединяющих все клетки в единую систему, при этом они же обеспечивают контакт с внешней средой как отдельных клеток, так и всего бактериального сообщества в целом. На рисунках 1 и 2 представлены ультратонкие срезы

фрагментов одно- и двухсуточной биопленок, на которых поверхность со стороны воздуха отделена защитным слоем – поверхностной пленкой разной толщины.

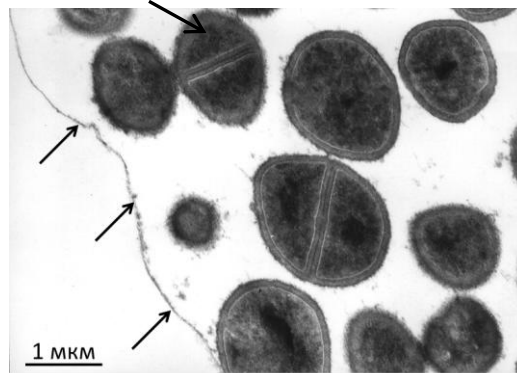


Рис.1. Ультратонкий срез фрагмента 1-суточной биопленки *S. aureus* 209. Тонкая поверхностная пленка. ТЭМ.



Рис. 2. Ультратонкий срез фрагмента 2-суточной смешанного микробного сообщества (биопленки) *Enterococcus faecalis* (\rightleftharpoons) и *E.coli* B (\rightarrow). Утолщенная поверхностная пленка. ТЭМ.

На рисунке 3 представлен ультратонкий срез фрагмента микробного сообщества *E.coli* B, в котором клетки окружены мембраноподобными структурами.

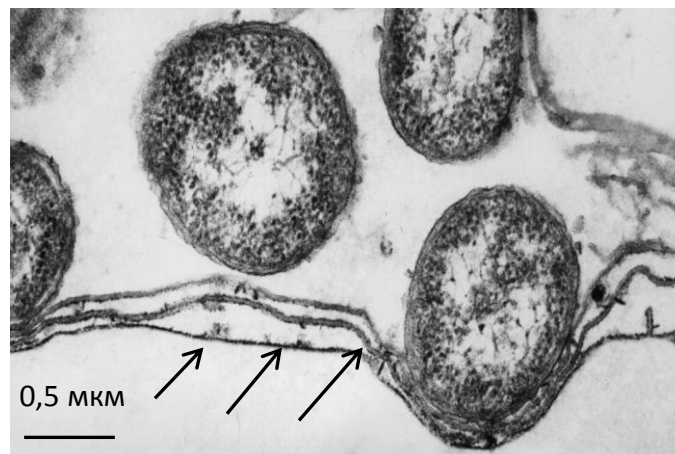


Рис. 3. Ультратонкий срез фрагмента микробного сообщества *E. coli* B. Клетки окружены мембраноподобными структурами. ТЭМ.

Структура, находящаяся с наружной стороны биопленки – поверхностная пленка, одновременно выполняет и защитную, и объединяющую микробное сообщество функцию. Основным элементом поверхностной пленки является трехслойная мембрана, ультратонкое строение которой соответствует универсальной плазматической мембране.

Поверхностная пленка в микробных сообществах *S. aureus* 209, наряду с трехслойной мембраной, включает дополнительные структуры в виде аморфных полисахаридных слоев, образующихся с внутренней или с внешней, а в некоторых случаях с обеих сторон одновременно (рис. 4).



Рис. 4. Ультратонкий срез фрагмента 2-суточной биопленки *S. aureus* 209, аморфная структура поверхностной пленки (→). ТЭМ.

Повышенная устойчивость условно патогенных бактерий разных таксономических групп к действию различных повреждающих факторов ассоциируется с экранированием клеток в биопленках полисахаридными слоями межклеточного матрикса, заполняющими толщу микробных сообществ (рис. 5, 6).

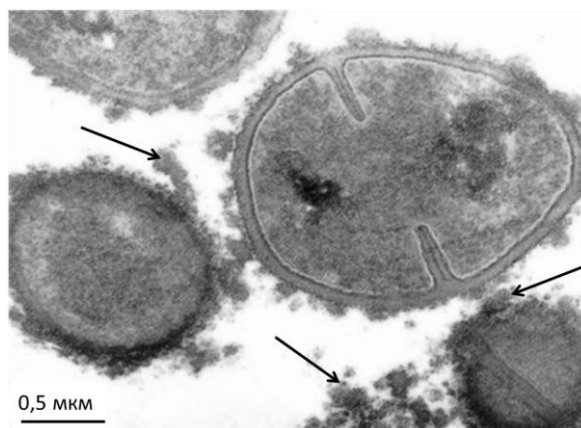


Рис.5. Ультратонкий срез фрагмента биопленки *S. aureus* 209, межклеточный матрикс (→). ТЭМ.

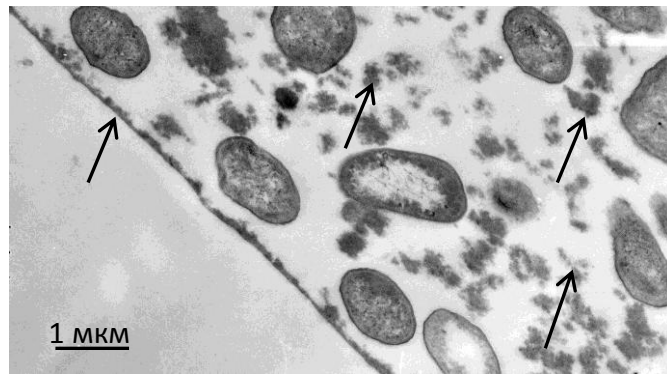


Рис.6. Ультратонкий срез фрагмента биопленки *E.coli* В, межклеточный матрикс (→). ТЭМ.

С проблемой организации и регуляции процесса образования биопленок напрямую связан вопрос активного синтеза бактериальными клетками различных биологически активных веществ, в частности, антибиотикоподобных субстанций – бактериоцинов [12]. Так, например, образование *in situ* представителями нормальной микрофлоры веществ, ответственных за антагонистическую активность, или возбудителями заболеваний – факторов патогенности, происходит, как правило, при достижении определенной плотности микробных популяций. В связи с этим важной задачей является изучение возможности использования данных субстанций для подавления развития биопленок в случае адгезии и колонизации условно патогенных бактерий.

При профилактике и комплексной бактериотерапии дисбактериозов кишечника необходимо учитывать уровень и спектр антагонистической активности вводимых в организм пробиотических бактерий. Показано, что при пероральном применении пробиотиков в кишечнике значительно дольше сохраняются те пробиотические интродуценты, которые синтезируют бактериоцины и бактериоциноподобные вещества [2, 20].

Для выявления механизмов воздействия бактериоцинов на развитие биопленок исследовали ультраструктурные изменения в клетках различных УПМ при их взаимодействии с бактериоциногенными лактобациллами *L. acidophilus* D75. Рисунок 7 демонстрирует ультратонкий срез фрагмента биопленки с явлениями деструкции клеток *P. mirabilis* ATCC 29906 при воздействии бактериоцинов *L. acidophilus* D75.

Аналогичные ультраструктурные изменения, обнаруженные в клетках других УПМ, в том числе *S. aureus*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* и дрожжей рода *Candida*, при

их совместном выращивании с лактобациллами проявлялись, как на клеточном, так и на популяционном уровнях [9, 12].

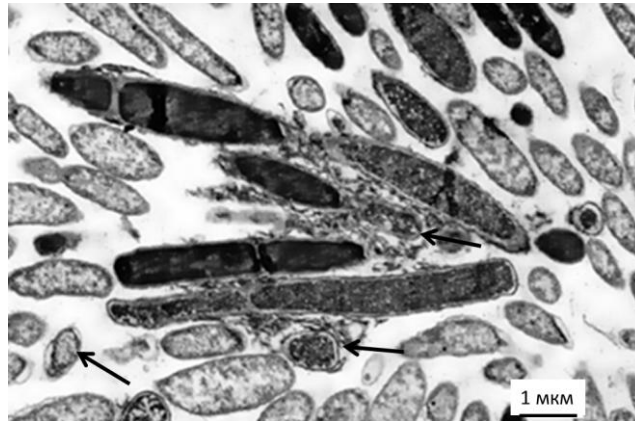


Рис.7. Ультратонкий срез фрагмента биопленки *P. mirabilis* ATCC 29906. Деструкция клеток *P. mirabilis* ATCC 29906 (→) при воздействии бактериоцинов *L. acidophilus* D75. ТЭМ. Ув. 23000.

Морфометрический анализ клеток условно патогенных бактерий свидетельствует о нескольких механизмах их повреждения. На популяционном уровне изменялось соотношение различных морфологических типов клеток тест-культур, что проявлялось в увеличении доли инволюционных, лизированных и покоящихся форм бактериальных клеток. Интенсивность выявленных ультраструктурных изменений в клетках условно патогенных бактерий коррелировала с продолжительностью воздействия бактериоцинов. Деструктивные изменения клеток тест-культур выражались в расширении периплазматического пространства, образовании фестончатых форм, разрежении цитоплазмы и разрушении белково-рибосомального комплекса. Во всех случаях *in vitro* отмечали подавление образования биопленок условно патогенных бактерий бактериоцинами.

Обсуждение

К настоящему времени накопилось значительное количество данных о том, что микроорганизмы *in vivo* существуют преимущественно в виде целостных и сложно организованных микробных сообществ – микроколоний и биопленок. Микробные сообщества представляют собой «социальные системы», характеризующиеся определенной кооперацией и функциональной специализацией, входящих в их состав клеток, что обеспечивает им ряд преимуществ. Образование микробных сообществ имеет важный биологический смысл, так как отдельные клетки, находясь в составе биопленок, лучше защищены от факторов врож-

денного иммунитета и действия этиотропных препаратов.

Следует отметить, что симбиотическая нормальная микрофлора, также как и местный инфекционный очаг в кишечнике, образованный условно патогенными бактериями, представляют собой смешанное микробное сообщество, функционирующее в составе "неслучайной" биопленки, распределенной по поверхности слизистой оболочки кишечника. Благодаря особой ультраструктурной организации микробных сообществ подобного типа, а именно наличию поверхностной пленки и активно развитому межклеточному матриксу, бактерии в биопленках характеризуются большей устойчивостью к действию химиотерапевтических препаратов и, очевидно, лучше защищены от фагоцитоза, действия лизоцима, белков системы комплемента, антител и цитокинов.

В настоящее время известна тенденция к возрастанию роли УПМ - представителей нормальной микрофлоры человека в развитии патологических процессов в кишечнике. Установлено, что синтез бактериями большинства факторов патогенности происходит при условии повышения плотности их популяции до определенного уровня (не менее $10^6/\text{см}^2$), что предполагает наличие соответствующих межклеточных коммуникативных связей. Механизмы некоторых коммуникативных связей бактерий хорошо изучены, а регуляция экспрессии определенных генов осуществляется в зависимости от плотности собственной популяции, контролируемой системой Quorum Sensing (чувство кворума) [8, 17]. В QS-системах регуляция происходит посредством выделяющихся в окружающую среду веществ – ауторегуляторов с установленной химической структурой. Такими агентами являются ацилированные лактоны гомосерина, регулирующие широкий круг плотностно-зависимых коммуникативных процессов у грамотрицательных бактерий, и пептиды, регулирующие экспрессию факторов патогенности, спорообразование, конъюгативный перенос плазмид и некоторые другие процессы у грамположительных бактерий.

По-видимому, хроническое течение и рецидивы инфекционных процессов, вызванных условно патогенной микрофлорой, могут ассоциироваться с увеличением в пристеночном слое слизистой оболочки кишечника, прилежащем к очагу воспаления, численности определенных УПБ, характеризующихся повышенной активностью синтеза ряда факторов патогенности [1,

2, 14]. Однако в настоящее время остается не ясным, почему в ряде случаев количество клеток возбудителя в биопсии поврежденной ткани настолько мало, что часто их можно выявить только молекулярно-генетическими методами, в частности полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Имеются многочисленные примеры, когда причиной одного и того же заболевания, склонного к рецидивирующему течению и хронизации патологического процесса, могут выступать различные представители условно патогенной микрофлоры того или иного микробного биотопа. Во всех случаях констатируют развитие инфекционного процесса при наличии в патологическом очаге того или иного “ведущего” патогенного агента на фоне увеличенной концентрации клеток различных видов условно патогенных бактерий и мощной местной воспалительной реакции. Пока не удастся установить на каких этапах развития инфекционного процесса идет формирование биопленки возбудителем, как долго она сохраняется, когда дезорганизуется и под воздействием каких факторов. По-видимому, может иметь место синергизм патогенетического действия этиологического агента и сформированного «патологического» микробного сообщества, развитие которых регулируется QS-системой.

Литература

1. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. М.: Изд-во «Триада», 2011. 88 с.
2. Бондаренко В.М. Обоснование и тактика назначения в медицинской практике различных форм пробиотических препаратов. Фарматека. 2012. 11: 89-99.
3. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. 308 с.
4. Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л., Лиходед В.Г. Микробный фактор и врожденный иммунитет в патогенезе атеросклероза. М.: Изд-во «Триада», 2013, 98 с.
5. Бухарин О.В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции. Журн. микробиол. 2011. 1: 93-97.
6. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки структура, регуляция, отторжение. Журн. микробиол. 2011. 1: 101-108.
7. Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Евтеева Н.И. и др. Межвидовое взаимодействие бактерий и образование смешанной (полимикробной) биопленки. Журн микробиол. 2011. 1: 93-101.
8. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011. 3: 100-110.
9. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М. Образование биопленок симбионтными представителями микробиоты кишечника как форма существования бактерий. Вестник СПбГУ. 2013. Сер.11. Вып.1: 179-186.
10. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Добрица В.П. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека. СПб.: Изд-во ИИЦ ВМА, 2008. 102 с.
11. Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Бондаренко В.М. Антимикробные пептиды лактоба-

- цилл. Журн. микробиол. 2013. 4: 89-100.
12. Рыбальченко О.В.; Бондаренко В.М.; Орлова О.Г. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл. Журн. микробиол. 2010. 6: 66-70.
 13. Савельев В.С., Петухов В.А. Липидный дистресс-синдром. 3-е изд. М.: МАКС-Пресс, 2010. 660 с.
 14. Чернин В.В., Бондаренко В.М., Червинец В.М., Базлов С.Н. Дисбактериоз мукозной микрофлоры эзофагогастродуоденальной зоны, его диагностика и лечение. М.: МИА, 2011. 144 с.
 15. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002. 15: 167-193.
 16. Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. J. Clin. Gastroenterol. 2008. 242 (Suppl. 3): S142-S143.
 17. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 2001. 55: 165-199.
 18. Pratt L.A., Kolter R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol. 1998. 30: 285-294.
 19. Reisner A., Krogfelt K.A., Klein B.M. et al. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic Escherichia coli strains: impact of environmental and genetic factors. J. Bacteriol. 2006. 188 (10): 3572-3581.
 20. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implication for fundamental and biomedical research. Appl. Environ. Microbiol. 2008. 74 (16): 4985-4996.

Поступила 27.03.2014 г.

(Контактная информация:

Рыбальченко Оксана Владимировна – д.б.н., профессор, Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России; 197110, С.-Петербург, ул. Пудожская, 7; E-mail: ovr@inbox.ru;
Бондаренко Виктор Михайлович – академик РАЕН, д.м.н., профессор, НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России; 123098, Москва ул.Гамалеи, 18; E-mail: bvmz@yandex.ru;
Орлова Ольга Геннадьевна – к.б.н., в.н.с., Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России 197110, С.-Петербург, ул. Пудожская, 7; E-mail: ovr@inbox.ru)