

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

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК СИМБИОТИЧЕСКИХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

¹ СПбГУ, Санкт-Петербург;

² ФБГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Симбиотические и условно-патогенные бактерии при колонизации желудочно-кишечного тракта могут формировать биопленки, способные выстилать поверхности слизистых оболочек. Образование биопленок зависит от способности бактерий к адгезии, благодаря наличию различных поверхностных структур: жгутиков, пилей и белков наружной мембраны. После завершения адгезии бактерии начинают активно выделять экзополисахариды, заполняющие межклеточное пространство, что обеспечивает устойчивость к действию повреждающих физико-химических факторов. Исследование ультраструктуры организации микробных сообществ симбиотических и условно-патогенных бактерий имеет важное биологическое значение, так как будет способствовать пониманию закономерностей, связанных с защитой микробных клеток в составе биопленок от факторов врожденного иммунитета и действия этиотропных препаратов.

Ключевые слова: симбиотические и условно-патогенные бактерии, бактериальные биопленки, ультраструктура, желудочно-кишечный тракт, микробиота.

STRUCTURE AND FUNCTIONS OF BACTERIAL BIOFILMS OF SYMBIOTIC AND OPPORTUNISTIC BACTERIA

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

¹ Saint Petersburg State University;

² N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Colonization of symbiotic and opportunistic bacteria in the gastrointestinal tract can cause to forming biofilms on their mucosal surfaces. Biofilm formation is dependent on the ability of bacteria to adhere on the surfaces due to the presence of different surface structures: flagella, pili and outer membrane proteins. After completion of the adhesion of bacteria begin actively secrete exopolysaccharides filling the extracellular space, which provides resistance to damaging physical and chemical factors. Study of ultrastructure organization of symbiotic and opportunistic bacterial communities has the biological significance, as it will contribute to the understanding of the laws related to the protection of microbial cells in the biofilms on the factors of innate immunity and the action etiotropic drugs.

Key words: symbiotic and opportunistic bacteria, bacterial biofilms, ultrastructure, gastrointestinal tract, microbiota.

В настоящее время уже не вызывает сомнений, что симбиотические и условно-патогенные бактерии (УПБ) при колонизации желудочно-кишечного тракта могут формировать биопленки – микробные

сообщества, способные наподобие бактериального «газона» выстилать поверхности слизистых оболочек. К биопленкам могут быть отнесены любые однородные или смешанные сообщества микроор-

ганизмов, имеющие способность прикрепляться к плотным, в том числе питательным субстратам. С помощью биопленок бактерии колонизируют разнообразные твердые органические субстраты, включая ткани макроорганизма [1, 2]. В современных условиях инфекции, вызываемые биопленочными формами бактерий, становятся все более опасными из-за широкого применения медицинских имплантатов (катетеров, различных протезов, шовного материала и пр.).

Образование биопленок связано с коммуникативным проявлением «чувства кворума» (Quorum Sensing) бактерий в сообществах, характеризующихся большой плотностью популяции и высокой физиологической активностью составляющих его особей [3, 4]. В настоящее время межклеточные коммуникации у микроорганизмов являются объектом пристального изучения и одним из наиболее приоритетных направлений развития микробиологии [5, 6].

Сравнительный анализ образования биопленок в исследованиях *in vitro* в 331 штамме *Escherichia coli*, в том числе в 105 штаммах, изолированных от здоровых людей, 68 – от детей с острой кишечной инфекцией, 90 – от пациентов с явлениями бактериемии и 68 – от мужчин с инфекцией мочевыводящих путей, – удалось выявить зависимость процесса образования биопленок от состава питательной среды и наличия у бактерий различных поверхностных структур: жгутиков, пилей и белков наружной мембраны. Образование биопленок на поверхности твердых субстратов могли стимулировать также полисахаридные капсулы и поверхностные полисахариды бактериальной клеточной стенки [7]. 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.

Биопленки пристеночного слоя слизи желудочно-кишечного тракта наряду с микроорганизмами содержат крупные включения муцина бокаловидных клеток. В таких биопленках 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.

Полагают, что развитие воспалительного процесса, вызванного УПБ, продуцирующими специфические протеазы, способные повреждать ткани макроорганизма, тесным образом связано с формированием биопленки возбудителями. В биопленках концентрация УПБ достигает плотности 10^6 – 10^9 клеток/см², что имеет важное значение для образования своего рода плацдарма, с которого происходит дальнейшая атака на макроорганизм «сгруппированного» в данном биотопе патогена. Образование микробных сообществ подобного типа имеет важный биологический смысл, так как микробные клетки, находясь в составе биопленок, лучше защищены от факторов

врожденного иммунитета и действия этиотропных препаратов.

Целью настоящей работы являлось изучение ультратонкой структуры однородных и смешанных микробных сообществ симбиотических бактерий нормальной микрофлоры и транзиторных условно-патогенных микроорганизмов при формировании биопленок *in vitro* (на поверхности плотных питательных сред).

Материалы и методы

В работе использовали музейные штаммы: *Bifidobacterium bifidum* 791, *Lactococcus lactis* 567, *Salmonella typhimurium* 415, *Escherichia coli* O157:H7, *Enterococcus faecium* SF68, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Candida albicans* 624 и клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa* PA-8 и *Burkholderia cepacia* BC-3. Проведены исследования по подавлению лактобациллами *L. acidophilus* Д75, продуцирующими бактериоциноподобное вещество, образования *in vitro* биопленок УПБ, в том числе *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. mirabilis* ATCC 29906, *C. freundii* ATCC 8090 и *C. albicans* 624. Антагонистическую активность лактобацилл определяли методом отсроченного антагонизма на среде МРС-1. Микроорганизмы получены из музея культур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва).

Применена трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) с использованием метода ультратонких срезов. Особенность подготовки препаратов для проведения электронно-микроскопического анализа методом ультратонких срезов заключалась в сохранении исходной структуры и пространственного расположения микробных клеток в исследуемой биопленке. С этой целью участки бактериального роста, вырезанные вместе с агаром, предварительно фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида на буфере Хенкса (рН = 7,2) при температуре 4 °С, 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 °С. 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 °С, 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.

При проведении сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) для получения препаратов биопленки фиксировали в парах 25%-ного раствора глутаральдегида на буфере Хенкса в течение 12 ч при температуре 4 °С. Затем биопленки подвергли обезвоживанию в серии спиртов возрастающей концентрации, в смеси 96° 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 УПБ методами ТЭМ и СЭМ выявило сложную ультратонкую организацию микробных сообществ данного типа, одним из основных компонентов которой является комплекс защитных структур [8]. На ультратонких срезах биопленки однородных и смешанных микробных сообществ бифидобактерий, лактобацилл, лактококков, энтерококков, стафилококков, псевдомонад, различных видов энтеробактерий и дрожжей рода *Candida*, выращенные на соответствующих плотных средах, со стороны воздуха защищены комплексом оригинальных поверхностных структур, которые объединяют все клетки в единую систему, обеспечивая при этом контакт с внешней средой как отдельных клеток, так и всего бактериального сообщества в целом (рис. 1).

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 (рис. 2).

Поверхностная пленка, наряду с трехслойной мембраной, включает дополнительные структуры в виде аморфных полисахаридных слоев, образующихся с внутренней либо с внешней стороны, а в некоторых случаях – и с обеих сторон одновременно (рис. 3).

Повышенная устойчивость бактерий к действию различных повреждающих факторов ассоциируется также с экранированием клеток в биопленке полисахаридными слоями межклеточного матрикса, заполняющими толщу микробного сообщества (рис. 4).

Поверхностная пленка служит универсальной защитной структурой в микробных сообществах различного типа, так как ранее была выявлена нами также в составе колоний разных видов бактерий [6].

С проблемой организации и регуляции процесса образования биопленок напрямую связан вопрос активного синтеза бактериальными клетками различных биологически активных веществ, в частности, антибиотикоподобных субстанций – бактериоцинов. Так, например, образование представителями нормальной микрофлоры *in situ* субстанций, ответственных за антагонистическую активность, или возбудителями заболеваний – факторов патогенности, происходит, как правило, при достижении определенной плотности микробных популяций. В связи с этим важной задачей представляется регуляция стимуляции образования биопленок симбиотическими для макроорганизма бактериями и подавление развития биопленок в случае адгезии и колонизации УПБ.

При профилактике и комплексной бактериотерапии дисбактериозов кишечника существенным моментом является уровень и спектр антагонистической активности вводимых в организм пробиотических бактерий. Показано, что при пероральном применении пробиотиков в кишечнике значительно дольше

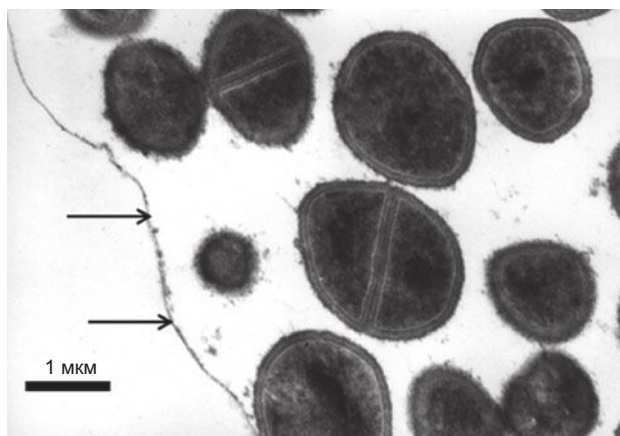


Рис. 1. ТЭМ. Ультратонкий срез фрагмента односуточной биопленки *S. aureus*, тонкая поверхностная пленка (стрелки). Ув. 40000



Рис. 2. ТЭМ. Ультратонкий срез фрагмента биопленки *Lactobacillus acidophilus*, трехслойная мембрана в толще поверхностной пленки (стрелки). ТЭМ. Ув. 40000

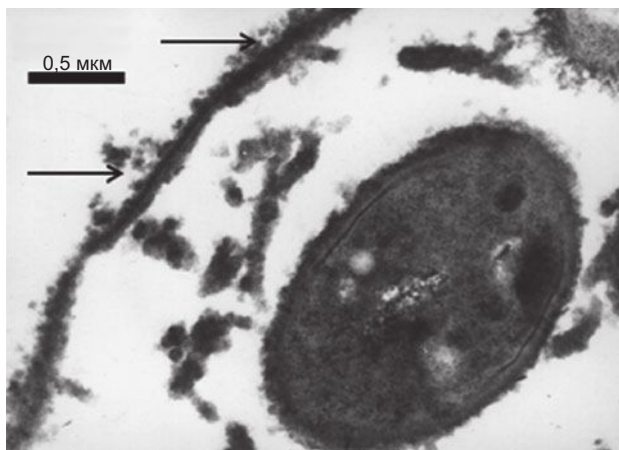


Рис. 3. ТЭМ. Ультратонкий срез фрагмента 2-суточной биопленки *S. aureus*, аморфная структура поверхностной пленки (стрелки). Ув. 68000

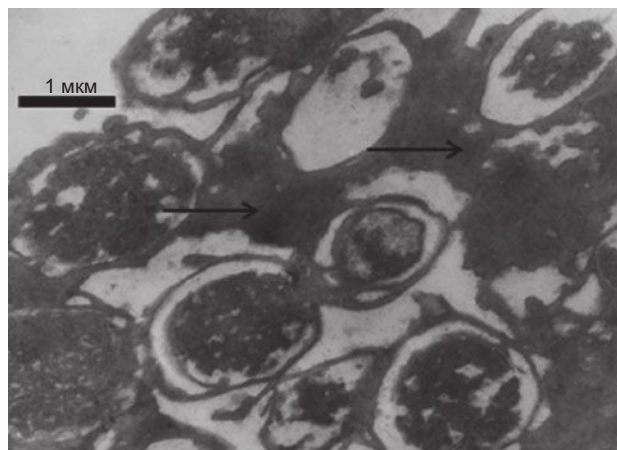


Рис. 4. ТЭМ. Ультратонкий срез фрагмента 3-суточной биопленки *Lactobacillus acidophilus*, многослойный межклеточный матрикс (стрелки). Ув. 40000

сохраняются те пробиотические интродуценты, которые синтезируют бактериоцины и бактериоциноподобные вещества [9].

С целью выявления механизмов действия бактериоцинов на развитие биопленок исследовали ультраструктурные изменения в клетках различных УПБ при их взаимодействии с бактериоциногенными лактобациллами *L. acidophilus* Д75. Установлено, что ультраструктурные изменения в клетках УПБ, в том числе клебсиелл, цитробактер, протеев, *P. aeruginosa*, *B. ceracia*, *E. coli* O157:H7 и *C. albicans*, при их совместном выращивании с лактобациллами проявлялись как на клеточном, так и на популяционном уровнях [10].

Морфометрический анализ клеток УПБ свидетельствует о нескольких механизмах их повреждения. На популяционном уровне изменялось соотношение различных морфологических типов клеток тест-культур, что проявлялось увеличением доли инволюционных, лизированных и покоящихся форм бактериальных клеток. Интенсивность выявленных ультраструктурных изменений в клетках УПБ коррелировала с продолжительностью воздействия бактериоцинов. Деструктивные изменения клеток тест-культур проявлялись расширением периплазматического пространства, образованием фестончатых форм, разрежением цитоплазмы и разрушением белково-рибосомального комплекса. Во всех случаях *in vitro* отмечалось подавление образования биопленок УПБ 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.

Следует отметить, что симбиотическая нормальная микрофлора кишечника, так же как и местный инфекционный очаг, образованный УПБ, 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 лучше защищены от фагоцитоза, действия лизоцима, белков системы комплемента, антител и цитокинов.

Известна тенденция к возрастанию роли УПБ – представителей нормальной микрофлоры человека в развитии патологических процессов в кишечнике. Установлено, что синтез большинства факторов патогенности бактериями 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 в зависимости от плотности собственной популяции на основе принципа аутоиндукции получила название Quorum Sensing (QS) – «чувства кворума» [11]. В QS-системах регуляция осуществляется 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, а также пептиды, регулирующие экспрессию факторов патогенности, спорообразование, конъюгативный перенос плазмид и некоторые другие процессы у грамположительных бактерий.

По-видимому, хроническое течение и рецидивы язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки как в присутствии, так и без выявления

Helicobacter pylori, могут ассоциироваться с увеличением в пристеночном слое слизистой оболочки кишечника, прилежащем к очагу воспаления, количества УПБ различных таксономических групп, характеризующихся повышенной активностью синтеза ряда факторов патогенности [12]. Однако в настоящее время остается неясным, почему в ряде случаев количество клеток возбудителя в биоптате поврежденной ткани настолько мало, что часто их можно выявить только молекулярно-генетическими методами, например, ПЦР. Можно также привести 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. Так, при вагинозах и вагинитах изолируют на высоком популяционном уровне представителей родов *Gardnerella*, *Mobiluncus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Candida*, *Mycoplasma*, при пародонтитах – *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus comitans*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, при кандидозном стоматите – *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Torulopsis glabrata*, при неспецифическом язвенном колите и болезни Крона – *Bacteroides vulgatus*, *Fusobacterium varium*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *E. coli* и др. Во всех перечисленных выше случаях констатируют развитие инфекционного процесса при наличии в патологическом очаге того или иного «ведущего» патогенного агента на фоне увеличенной концентрации клеток различных видов УПБ 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 микробного сообщества, развитие которых регулируется QS-системой.

Заключение

Выявленные на электронно-микроскопическом уровне морфофизиологические изменения бактериальных биопленок отражают ультраструктурную картину проявления взаимоотношений микроорганизмов во внутривидовых и межвидовых сообществах. Полученные данные свидетельствуют о разнохарактерном ответе бактериальных клеток, содержащихся в биопленках, при симбиотических или антагонистических отношениях, отражающих особое социальное поведение микроорганизмов на популяционном и клеточном уровнях. Электронно-микроскопический анализ структуры микробных популяций может быть использован при подборе наиболее эффективных штаммов индигенных бактерий при создании новых препаратов-пробиотиков.

Литература /References

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. et al. Microbial biofilms // Annu. Rev. Microbiol. – 1995. – 49. – P. 711–745.
2. Рисман Б.В., Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М. и др. Подавление бактериальных биопленок при гнойно-некротических осложнениях синдрома диабетической стопы методом ультразвуковой кавитации // Журн. микробиол. – 2011. – 4. – С. 14–19.
3. Рисман Б.В., Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М. и др. Podavlenie bakterial'nyh bioplenok pri gnojno-nekroticheskikh oslozhnenijah sindroma diabeticheskoj stopy metodom ul'trazvukovoj kavitacii // Zhurn. mikrobiol. – 2011. – 4. – S. 14–19.
3. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий // Журн. микробиол. – 2003. – 5. – С. 86–93.
4. Gincburg A.L., Il'ina T.S., Romanova Ju.M. «Quorum sensing» ili social'noe povedenie bakterij // Zhurn. mikrobiol. – 2003. – 5. – S. 86–93.
4. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – 55. – P. 165–199.
5. Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // Микробиология. – 2000. – 69 (3). – С. 309–327.
5. Oleskin A.V., Botvinko I.V., Cavkelova E.A. Kolonial'naja organizacija i mezhkletocchnaja kommunikacija u mikroorganizmov // Mikrobiologija. – 2000. – 69 (3). – S. 309–327.
6. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений // Микробиология. – 2006. – 75 (4). – С. 550–555.
6. Rybal'chenko O.V. Jelektronno-mikroskopicheskoe issledovanie mezhkletocnyh vzaimodejstvij mikroorganizmov pri antagonistsicheskom haraktere vzaimootnoshenij // Mikrobiologija. – 2006. – 75 (4). – S. 550–555.
7. 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). – P. 3572–3581.
8. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Ларионов И.В. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл // Журн. микробиол. – 2010. – 6. – С. 66–70.
8. Rybal'chenko O.V., Bondarenko V.M., Larionov I.V. i dr. Dezorganizacija bioplenok klinicheskikh shtammov stafilokokkov metabolitami laktobacill // Zhurn. mikrobiol. – 2010. – 6. – S. 66–70.
9. Бондаренко В.М. Прикладные аспекты молекулярной биологии бифидобактерий и лактобацилл // Журн. микробиол. – 2006. – 2. – С. 89–97.
9. Bondarenko V.M. Prikladnye aspekty molekularnoj biologii bifidobakterij i laktobacill // Zhurn. mikrobiol. – 2006. – 2. – S. 89–97.
10. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В. Ультраструктурные изменения лактобацилл при подавлении их роста клиническими штаммами *Candida albicans* // Журн. микробиол. – 2009. – 4. – С. 96–99.
10. Bondarenko V.M., Rybal'chenko O.V. Ul'trastrukturnye izmenenija laktobacill pri podavlenii ih rosta klinicheskimi shtammami *Candida albicans* // Zhurn. mikrobiol. – 2009. – 4. – S. 96–99.
11. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. – 2004. – 40 (11). – С. 1–12.
11. Il'ina T.S., Romanova Ju.M., Gincburg A.L. Bioplenki kak sposob sushhestvovanija bakterij v okruzhajushhej srede i organizme hozjaina: fenomen, geneticheskij kontrol' i sistemy reguljacii ih razvitiya // Genetika. – 2004. – 40 (11). – S. 1–12.
12. Бондаренко В.М., Червинцев В.М., Воробьев А.А. Роль персистирующих условно-патогенных бактерий в патогенезе

язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки // Журн. микробиол. – 2003. – 4. – С. 11–17.

Bondarenko V.M., Chervinets V.M., Vorob'ev A.A. Rol' persistirujushhih uslovno-patogennyh bakterij v patogeneze jazvennoj bolezni zheludka i 12-perstnoj kishki // Zhurn. mikrobiol. – 2003. – 4. – S. 11–17.

Рыбальченко Оксана Владимировна (контактное лицо) – профессор кафедры физиологии медицинского факультета СПбГУ. Тел. 8 (950)-037-80-23; e-mail: OVR@inbox.ru