

МИКРОБНЫЕ БИОПЛЕНКИ И СПОСОБЫ ИХ ОБНАРУЖЕНИЯ

Соколова Т.Н.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

В статье изложены основные характеристики микробных биопленок, процессы формирования их микроорганизмами, роль биопленок в патологических процессах и современные способы их обнаружения.

Ключевые слова: микробные биопленки, методы обнаружения.

Находясь в организме человека, микроорганизмы оказываются в жестких условиях борьбы за выживание с иммунной системой и другими микроорганизмами. В биотопах, населенных разными микроорганизмами, возникают чрезвычайно разнообразные взаимоотношения между популяциями, которые определяются обычно пищевыми и пространственными «интересами». Микроорганизмы, обмениваясь друг с другом веществами, энергией, и как все живые организмы на нашей планете, подчиняются законам термодинамики, смысл которых сводится к высокой упорядоченности своих компонентов с целью сохранения определенного уровня энергии для противостояния энтропии, т.е. необратимому рассеиванию. Поэтому они вступают в различные симбиотические связи, позволяющие им выжить в разных условиях. Примером таких связей является образование биопленок (biofilms) на разных поверхностях. Образование биопленок – один из факторов патогенности микроорганизмов, поэтому многие инфекционные процессы начинаются именно с их образования [2, 18].

Биопленки представляют собой плотные скопления разного рода микроорганизмов, склеенных между собой и плотно прикрепленных к поверхности. В качестве своеобразного «клея» для прикрепления друг к другу микроорганизмы используют слизь, представляющую собой полимеры мукополисахаридов и белков на поверхности клеточной стенки, которые входят в состав капсулы. Образование ее детерминируется в ДНК микроорганизмов и служит для защиты от фагоцитоза и антител. Вместе с тем биопленки – это не просто многослойный конгломерат различных микроорганизмов, как это полагали ранее. Благодаря современным методам изучения, таким как, например, трансмиссионная электронная микроскопия, выяснено, что процесс формирования биопленки проходит определенные последовательные стадии развития [13], включающие свободно плавающие планктонные стадии, стадии прикрепления к поверхностям друг друга, образование внеклеточной полисахаридной слизи, с помощью которой скрепляются вместе сообщества. В результате образуется сложная архитектурная структура, которая больше походит на грибовидные острова, разделенные каналами, что позволяет питательным веществам достичь большей части сообщества биопленки [15].

Большинство представителей нормальной микрофлоры в организме человека образуют биопленки [1, 4, 8, 19]. Необходимо отметить, что степень адгезии и способность к пленкообразованию среди микроорганизмов одного вида зависит от экспрессии соответствующих генов и коррелирует со степенью вирулентности [12]. Существование микроорганизмов в таком виде обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными клетками. В этих сообществах они приобретают повышенную способность к выживанию в присутствии агрессивных веществ, устойчивость к антибиотикам и дезинфектантам, лег-

ко могут обмениваться генами резистентности, становятся невосприимчивыми к воздействию факторов иммунной системы хозяина, фагоцитозу [17, 9]. Так, при микроскопии клинических образцов из крипт удаленных миндалин было отмечено, что клеточный воспалительный инфильтрат был локализован только по периферии биопленки, и клетки воспаления не проникали в массу микроорганизмов, формирующих биопленку [6]. Находясь в тесном контакте, микроорганизмы могут обмениваться участками ДНК не только между бактериями одного вида, но и между другими видами, входящими в состав биопленки. Описан феномен кворумной сигнализации – сетевой коммуникации бактерий (*Quorum Sensis*), координирующей экспрессию бактериальных генов в зависимости от условий внешней среды [14, 21]. В результате они получают новые свойства, позволяющие им приспосабливаться к разным условиям окружающей среды, приобретают множественную устойчивость к антибиотикам. Биопленки устойчивы к смыванию потоком жидкости и, таким образом, не удаляются из организма и могут сохраняться там в течение длительного времени [14]. Причину такой повышенной выживаемости объясняют в том числе и особыми свойствами клеток и внеклеточного матрикса. Клетки биопленок уменьшают свои свободные поверхности за счет контактов друг с другом и формированием в популяции особых клеток, получивших название «персистеры» (*Persister*) [16]. Персистеры – это бактерии, находящиеся в относительно инертном состоянии, метаболические процессы которых значительно снижены. Это делает их менее восприимчивыми к антибиотикам, большинство из которых лучше всего работают при действии именно на быстро растущие клетки [16]. Установлено, что бактерии и грибы в биопленках выживают в присутствии антибиотиков в 500-1000 раз больших, чем их минимальная подавляющая концентрация *in vitro* в планктонной форме [6, 20]. Образование биопленки идет достаточно быстро, экспериментально показано, что начальные элементы биопленки могут сформироваться в течение двух часов инкубации, достигая максимальной интенсивности уже через 24 часа [20].

Биопленки представляют большую проблему в медицине. Они могут образовываться как на поврежденных участках тела человека, так и в ранах, покрывать поверхности катетеров, искусственных имплантантов, протезов и т.д. Налет, который образуется на зубах и вызывает кариес или пародонтит, фактически представляет собой биопленки. Состоят они из разных микроорганизмов, в них преобладают преимущественно аэробные микроорганизмы, когда они находятся выше края десны, в более глубоких слоях, расположенных ниже линии десен или в фиссурах, – доминируют анаэробные или факультативно-анаэробные бактерии [12]. Зубной налет, который не удалится, в течение определенного времени минерализуется, и в этом месте формируется зубной ка-

мень [15]. Разрушить такой налет – непростая задача, и тот, кто побывал в кабинете стоматолога с целью удаления зубного камня, прекрасно представляет, какая нелегкая это задача. Если не удалять регулярно такие бляшки, в этом месте может возникнуть кариес, воспаление десен (гингивит), или даже заболевание пародонта, что в конечном итоге ведет к потере зуба. Связано это прежде всего с тем, что в условиях отсутствия кислорода анаэробные микроорганизмы и факультативно-анаэробные бактерии, которые также переключаются на анаэробный тип дыхания, интенсивно вырабатывают кислоту. Образующаяся кислота приводит к деминерализации поверхности зубов и в последующем – к кариесу [15, 12].

Биопленки могут состоять из микроорганизмов не только одного вида (монокультуры), но в ее составе могут быть два и более различных видов (поликкультуры) [1, 4, 8, 19]. Среди возбудителей, образующих биопленки, наибольшее клиническое значение имеют *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Candida spp.* и др. [1]. У многих из них обнаружены гены, кодирующие образование полисахаридов межклеточной адгезии, что способствует быстрому прилипанию микроорганизмов к поверхностям и друг к другу [14, 21]. Так, при ожогах в раны проникают *P. aeruginosa*, они интенсивно колонизируют поверхности и формируют биопленки, что способствует утяжелению протекания инфекции и осложняет лечение. С образованием биопленок связывают особенности течения инфекционного процесса при вентилятор-ассоциированной пневмонии, ангиогенном сепсисе, уроинфекциях, инфекционном эндокардите, муковисцидозе, хроническом бактериальном простатите, периодонтите, остром среднем отите, хронических фарингитах и др.

Биопленки образуются и в окружающей среде: воде, земле и даже на частичках пыли, переносимых в воздухе [2, 4]. Одной из причин возникновения «болезни легионеров» послужило образование биопленок, содержащих легионеллы на воздуховодных стенках кондиционеров, а затем попаданием в большом количестве этих микроорганизмов в виде аэрозоли в воздух и легкие людей [2]. Изобретение пластика послужило широкому его применению в медицине, однако микроорганизмы быстро адаптировались к этой новинке и научились весьма искусно адсорбироваться на нем, образуя биопленки. Различные пластиковые трубки в виде всевозможных катетеров могут длительно находиться в теле человека и быть не только хорошими проводниками, нарушая важные оборонительные барьеры, такие как кожа, слизистые, сфинктеры мочеиспускательного канала, но и местом образования биопленок. Пластиковые имплантаты, например, клапан сердца, стент, суставы, покрываясь биопленкой, могут стать «бомбой замедленного действия» и «взорваться» септическим шоком в результате отрыва бактериальных клеток от биопленки и в большом количестве попасть в кровоток. Такие имплантаты должны быть удалены, поскольку антибиотики не эффективны в этих условиях.

В современной микробиологии существует целый ряд методов, позволяющих культивировать микробные биопленки и визуализировать их как *in vivo*, так и *in vitro*. Эти методы дают возможность изучать особенности жизнедеятельности микробных биопленок, скорость и условия их формирования, вести визуальное наблюдение в режиме реального времени, изучать адгезивную способность микроорганизмов

к абиотическим и биотическим объектам, влияние химических и физических факторов на формирование и разрушение биопленок; выявлять в популяции микроорганизмов штаммы, обладающие повышенной способностью к образованию биопленок.

Существует достаточно большое количество методов, позволяющих провести визуализацию сформировавшихся бактериальных пленок. К методам, которые визуализируют ультраструктуру микробных сообществ, можно отнести электронную микроскопию и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (CLSM). Другие методы основаны на сорбции молекул красителя на структурах биопленки, с последующей их отмывкой (десорбцией) в органические растворители. Такой способ индикации биопленок наиболее часто используется в статических методах культивирования микробных биопленок и позволяет дать условную количественную характеристику образовавшимся микробным сообществам, т.е. чем больше образуется матрикс биопленки, тем больше красителя сорбируется на его поверхности и тем выше оптическая плотность образца [5, 3]. Измерение биоломинесценции (BPI) – достаточно новый метод изучения и детекции биопленок, который используется как *in vitro*, так и *in vivo*. При искусственном введении в бактерии плазмид, ответственных за синтез люминесцирующего белка, проводится визуализация как адгезированных бактерий, так и матрикс биопленки [11]. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) также стал сравнительно недавно использоваться для изучения биопленок в медицине (данный метод часто совмещается с методом CLSM). Метод гибридизации применяют для детекции и определения расположения специфических мРНК в клетках, образующих биопленки, что позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в бактериях. С помощью этого метода была определена неоднородность бактерий в биопленке и выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции во время воздействия летальных для основной массы клеток факторов [7, 10].

Новые сведения о микроорганизмах стали толчком для введения дополнительного параметра оценки эффективности антибиотиков. К показателям определения минимальной ингибирующей концентрации – МИК, минимальной бактерицидной концентрации – МБК, добавился показатель определения минимальной концентрации, подавляющей рост биопленки (ВЕС) [21].

Таким образом, в настоящее время доказана способность подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов формировать биопленки. Показано, что образование биопленок – не только один из факторов патогенности микроорганизмов, но и процесс, который ведет к значительному изменению их чувствительности к антибактериальным химиопрепаратам. Осмысление этого побуждает пересматривать принципы терапии инфекционных заболеваний, является веской причиной разработки средств и методов, влияющих на формирование либо разрушение биопленок. Разработка и стандартизация таких методов позволит применять их в практической микробиологии с целью выбора рациональной антимикробной химиотерапии, оценки ее эффективности, а также для выявления циркуляции в стационарах штаммов микроорганизмов с повышенной способностью к формированию биопленок и адгезии на медицинском оборудовании.

Литература

1. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Том 2, №3. – С. 4-15.
2. Тец, В.В. Бактериальные сообщества / В.В. Тец // Клеточные сообщества / В. Тец [и др.]; под ред. В. Теца. - СПб.: Изд-во СПбГМУ, 1998. - С. 15-73.
3. A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm images / J. Yerly [et al.] // J. of Microbiological Methods. – 2007. - Vol. 70. –P. 424-433.
4. Bacterial biofilms and infection / I. Lasa [et al.] // An. Sist. Sanit. Navar. - 2005. - Vol. 28, №2. - P.163-175.
5. Camargo, A.C. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy / A.C. Camargo, E.L. Pizzolitto // International J. of Gynecology and Obstetrics. – 2005. Vol. 90. - P.148-149.
6. Chole, R.A. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity / R.A. Chole, B.T. Faddis // JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery. – 2003. – Vol. 129, №6. – P. 634-636.
7. Costerton, J.W. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infection / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // Science. - 1999. - Vol. 284. - P. 1318-1322.
8. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents / D. Davies // Nature reviews. Drug discovery. - 2003. - Vol. 2. – P. 114-122.
9. Edlund, C. The relationship between an increase in β -lactamase activity after oral administration of three new cephalosporins and protection against intestinal ecological disturbances / C. Edlund, C. Stark, C.E. Nord // J. Antimicrob. Chemother. - 1994. - Vol. 34. - P. 127-138.
10. Fluorescence «in situ» hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa / L. Nistico [et al.] // Methods in Molecular Biology. – 2009. - Vol. 493. - P. 191-213.
11. Kadurugamuwa, J.L. Bioluminescent imaging of bacterial biofilm infections in vivo / J.L. Kadurugamuwa, K.P. Francis // Methods in Molecular Biology. - 2008. - Vol. 431. - P. 225-239.
12. Marsh, P.D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease / P.D. Marsh // BMC Oral Health. - 2006. - Vol. 6 (Suppl 1): S14.
13. Nield-Gehrig J. Shiffer, Section 2: Biofilms / J. Shiffer Nield-Gehrig, D.E. Willmann // Foundations of Periodontics for the Dental Hygienist / J. Shiffer Nield-Gehrig, D.E. Willmann. - Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – P. 71-82.
14. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // Annual review of microbiology. - 2000. - Vol. 54. - P. 49-79.
15. Overman, P.R. Biofilm: A New View of Plaque / P.R. Overman // The Journal of Contemporary Dental Practice. – 2000. – Vol. 1, №3. – P. 18-29.
16. Persister Cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli* / J.J. Harrison [et al.] // Microbiology. - 2005. - Vol. 151. - P.3181-3195.
17. Salyers, A.A. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? / A.A. Salyers, C.F. Amabile-Cuevas // Antimicrob. Agents Chemother. - 1997. - Vol. 41, №11. - P. 2321-2325.
18. Sbordone, L. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease / L. Sbordone, C. Bortolaia // Clin. Oral Invest. – 2003. – Vol. 7. - P. 181-188.
19. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren [et al.] // J. of Bacteriology. - 2004. - Vol. 186. - P. 8172-8180.

Literatura

1. Gostev, V.V. Bacteriálne bioplenki i infekcii / V.V. Gostev, S.V. Sidorenko // Gurnal infektologii. – 2010. – Tom 2, №3. – S. 4-15.
2. Tec, V.V. Bacteriálne spoločenstvá / V.V. Tec // Kletocchnye spoločenstvá / V. Tec [i dr.]; pod red. V. Tec. - SPb.: Izd-vo SPbGMU, 1998. - S. 15-73.
3. A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm images / J. Yerly [et al.] // J. of Microbiological Methods. – 2007. - Vol. 70. –P. 424-433.
4. Bacterial biofilms and infection / I. Lasa [et al.] // An. Sist. Sanit. Navar. - 2005. - Vol. 28, №2. - P.163-175.
5. Camargo, A.C. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy / A.C. Camargo, E.L. Pizzolitto // International J. of Gynecology and Obstetrics. – 2005. Vol. 90. - P.148-149.
6. Chole, R.A. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity / R.A. Chole, B.T. Faddis // JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery. – 2003. – Vol. 129, №6. – P. 634-636.
7. Costerton, J.W. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infection / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // Science. - 1999. - Vol. 284. - P. 1318-1322.
8. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents / D. Davies // Nature reviews. Drug discovery. - 2003. - Vol. 2. – P. 114-122.
9. Edlund, C. The relationship between an increase in β -lactamase activity after oral administration of three new cephalosporins and protection against intestinal ecological disturbances / C. Edlund, C. Stark, C.E. Nord // J. Antimicrob. Chemother. - 1994. - Vol. 34. - P. 127-138.
10. Fluorescence «in situ» hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa / L. Nistico [et al.] // Methods in Molecular Biology. – 2009. - Vol. 493. - P. 191-213.
11. Kadurugamuwa, J.L. Bioluminescent imaging of bacterial biofilm infections in vivo / J.L. Kadurugamuwa, K.P. Francis // Methods in Molecular Biology. - 2008. - Vol. 431. - P. 225-239.
12. Marsh, P.D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease / P.D. Marsh // BMC Oral Health. - 2006. - Vol. 6 (Suppl 1): S14.
13. Nield-Gehrig J. Shiffer, Section 2: Biofilms / J. Shiffer Nield-Gehrig, D.E. Willmann // Foundations of Periodontics for the Dental Hygienist / J. Shiffer Nield-Gehrig, D.E. Willmann. - Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – P. 71-82.
14. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // Annual review of microbiology. - 2000. - Vol. 54. - P. 49-79.
15. Overman, P.R. Biofilm: A New View of Plaque / P.R. Overman // The Journal of Contemporary Dental Practice. – 2000. – Vol. 1, №3. – P. 18-29.
16. Persister Cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli* / J.J. Harrison [et al.] // Microbiology. - 2005. - Vol. 151. - P.3181-3195.
17. Salyers, A.A. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? / A.A. Salyers, C.F. Amabile-Cuevas // Antimicrob. Agents Chemother. - 1997. - Vol. 41, №11. - P. 2321-2325.
18. Sbordone, L. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease / L. Sbordone, C. Bortolaia // Clin. Oral Invest. – 2003. – Vol. 7. - P. 181-188.
19. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren [et al.] // J. of Bacteriology. - 2004. - Vol. 186. - P. 8172-8180.

20. Struthers, J.K. The use of a continuous culture system to study the antimicrobial susceptibility of bacteria in biofilms / J.K. Struthers // *Methods in Molecular Biology*. - 2001. - Vol. 48. - P. 215-225.

21. Watnick, P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // *J. of Bacteriology*. - 2000. - Vol. 182. - P. 2675-2679.

Bacteriology. - 2004. - Vol. 186. - P. 8172-8180.

20. Struthers, J.K. The use of a continuous culture system to study the antimicrobial susceptibility of bacteria in biofilms / J.K. Struthers // *Methods in Molecular Biology*. - 2001. - Vol. 48. - P. 215-225.

21. Watnick, P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // *J. of Bacteriology*. - 2000. - Vol. 182. - P. 2675-2679.

MICROBIAL BIOFILMS AND WAYS OF THEIR DETECTION

Sokolova T.N.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

The article describes the main characteristics of microbial biofilms, the processes of their formation by micro-organisms, the role of biofilms in the pathological processes and modern methods for their detection.

Key words: *microbial biofilm, detection methods.*

Адрес для корреспонденции: e-mail: sakalova@tut.by

Поступила 09.10.2014