

РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ В ПЕРСИСТЕНЦИИ И БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ РАЗЛИЧНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ

Сизова Ю.В., Черепахина И.Я., Бурлакова О.С.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: yuisa@mail.ru

Биопленочное сообщество – одна из основных стратегий выживания бактерий в окружающей среде. С учетом значимости проблемы выяснения закономерностей персистенции холерных вибрионов различной эпидемической значимости в воде открытых водоемов были проведены опыты по оценке влияния стрессовых температурных условий на персистенцию и процесс биопленкообразования холерных вибрионов. В результате проведенных исследований было показано, что эпидемически значимые токсигенные холерные вибрионы в условиях стерильной речной воды достаточно быстро (в течение 2–3 месяцев) погибают, причем гибель идет тем быстрее, чем ниже температура. Это свидетельствует об ограниченной возможности персистенции эпидемически значимых холерных вибрионов в водоемах Российской Федерации в холодное время года. При этом показатели выживаемости коррелируют с показателями биопленкообразования. Непатогенные и условно эпидемически значимые вибрионы выживают в речной воде и сохраняют биопленки достаточно продолжительное время, что свидетельствует о выраженном персистентном потенциале.

Ключевые слова: биопленка, холерный вибрион, персистенция.

THE ROLE OF SURFACE WATER BODY TEMPERATURE IN PERSISTENCE AND BIOFILM FORMATION IN VIBRIO CHOLERAЕ STRAINS OF DIFFERENT EPIDEMIC SIGNIFICANCE

Sizova U.V., Cherepakhina I.J., Burlakova O.S.

The Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Agency on Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: yuisa@mail.ru

Biofilm community – one of the main survival strategies of bacteria in the environment. Given the importance of the problem of identifying patterns of persistence of *V. cholerae* of different epidemic significance in open water bodies, the experiments were conducted to assess the effect (influence) of stress temperature conditions on persistence and biofilm formation in *V. cholerae*. The studies showed that toxigenic *V. cholerae* of epidemic significance in sterile river water died fairly quickly (within 2–3 months), and their death accelerated with temperature decrease. This observation is indicative of the limited possibility of persistence of *V. cholerae* with epidemical potential in water bodies of the Russian Federation in cold season. Nevertheless, the survival rates correlate with those of biofilm formation. Non-pathogenic and potentially epidemically significant vibrios survive in river water and retain biofilms long enough to serve the evidence of a marked potential for persistence.

Keywords: biofilm, *Vibrio cholerae*, persistence.

Как известно, большинство бактерий существует в виде биопленок, образуемых на самых разных биотических и абиотических поверхностях. Развитие биопленочных сообществ – одна из основных стратегий выживания бактерий не только в организмах инфицируемых хозяев, но и в окружающей среде [3]. В составе биопленок бактерии отличаются значительной устойчивостью к действию антибактериальных препаратов, включая антибиотики и факторы иммунной защиты организма, а также к воздействию факторов окружающей среды, таких как изменения температуры, рН среды, осмолярности. Выживаемость бактерий биопленочных сообществ в различных стрессовых условиях

обеспечивается сложной структурной организацией биопленок [8].

Основным фактором устойчивости биопленок является экзополисахаридный матрикс, вырабатываемый клетками бактерий сразу после прикрепления к субстрату. Он непостоянен по составу и меняется в результате адаптации бактерий к условиям окружающей среды, основу его составляют экзополисахариды, липополисахариды, гликопротеины и протеогликаны [4,9]. Эти биополимеры в микробной пленке действуют как молекулярное сито, улавливая и концентрируя питательные вещества из окружающей среды, а также ограничивая проникновение агрессивных агентов к бактериям в глубине биопленки [7].

Механизм и особенности формирования биопленок у холерных вибрионов в эксперименте достаточно хорошо изучены [5,10]. Однако свойства холерных вибрионов при персистенции их в биопленках и влияние на процесс их образования различных стрессорных факторов исследованы недостаточно [1,2,6]. Мало изучен вопрос о роли низкотемпературного стресса в выживании планктонных и биопленочных форм холерных вибрионов различной эпидемической значимости в воде открытых водоемов, а эти сведения чрезвычайно важны при планировании мероприятий по эпиднадзору за холерой в Российской Федерации.

Цель исследования: с учетом значимости проблемы выяснения закономерностей персистенции холерных вибрионов различной эпидемической значимости в воде открытых водоемов провести масштабные по продолжительности эксперименты (9 месяцев) по оценке влияния стрессовых температурных условий на процесс биопленкообразования.

Материалы и методы: в работе использовано 22 штамма *Vibrio cholerae* Эль Тор, имеющих различный набор детерминант патогенности, выделенных от больных, вибрионосителей и из речной воды. Для решения поставленных задач холерные вибрионы инкубировали в стерильной речной воде (конечная концентрация $1 \cdot 10^7$ м.к./мл) в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ и в комнатном термостате при $+22^{\circ}\text{C}$ в течение 9 месяцев, а также (при моделировании условий пребывания возбудителя холеры в речной воде в летнее, осеннее, зимнее время) эксперимент продолжали 2 месяца при 22°C , 2 месяца – при 10°C , 5 месяцев – при 4°C . Ежемесячно производили высевы на агар Мартена для определения количества планктонных форм холерных вибрионов, а также определяли оптическую плотность биопленок на спектрофотометре Cary50.

Результаты исследования

В первой серии опытов, проводимых с использованием речной воды (таблица 1, рисунок 1), установлено, что у токсигенных (ctx+tcp+) штаммов при 22°C на протяжении всего срока исследования количество клеток в популяции, начиная с конца первого месяца эксперимента, постепенно снижалось ($20\% \rightarrow 0,15\%$), при этом вибрионы формировали

«слабые» биопленки (значения оптической плотности (ОП) были низкими и лишь незначительно увеличивались к 4–5 месяцу исследования). При стрессовой низкой температуре (4 °С) все токсигенные штаммы практически отмирали к 3 месяцу исследования (выжившие клетки при этой температуре составляли всего десятые доли процента, возможно часть популяции при этом переходила в некультивируемое состояние. Сведения о такой возможности приводятся в работах Е.С. Куликаловой с соавт. [5,6]. Кроме этого, показано, что при 4 °С токсигенные холерные вибрионы формировали через 1–2 месяца, наряду с типичными колониями, «ругозные» варианты, которые постепенно отмирали в стрессовых условиях.

Таблица 1

Средние значения выживаемости холерных вибрионов в речной воде в течение 9 месяцев при 22 °С и 4 °С

срок культиви- рования, месяцы	Ранжирование штаммов по эпидемической значимости											
	Температура культивирования 22 °С						Температура культивирования 4 °С					
	ctx+tcp+		ctx-tcp+		ctx-tcp-		ctx+tcp+		ctx-tcp+		ctx-tcp-	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	2*10 ⁶	20	6,4*10 ⁶	64	3*10 ⁶	30	2,2*10 ⁵	2,2	5,5*10 ⁶	55	5*10 ⁶	50
2	1*10 ⁵	1	5*10 ⁶	50	2,7*10 ⁶	27	1,2*10 ⁴	0,12	4,2*10 ⁶	42	3,6*10 ⁶	36
3	1*10 ⁵	1	3*10 ⁶	30	1,4*10 ⁶	14	0	0	3*10 ⁶	30	2*10 ⁶	20
4	1*10 ⁵	1	4,5*10 ⁶	45	1,8*10 ⁶	18	0	0	3,5*10 ⁶	35	2*10 ⁶	20
5	4*10 ⁴	0,4	3*10 ⁶	30	1*10 ⁶	10	0	0	3*10 ⁶	30	1,5*10 ⁶	15
6	3,5*10 ⁴	0,35	2,6*10 ⁶	26	8*10 ⁵	8	0	0	6*10 ⁵	6	9*10 ⁵	9
7	2*10 ⁴	0,2	1,5*10 ⁶	15	3*10 ⁵	3	0	0	5,6*10 ⁵	5,6	1*10 ⁶	10
8	1*10 ⁴	0,1	1*10 ⁶	10	2*10 ⁵	2	0	0	5*10 ⁵	5	7,5*10 ⁵	7,5
9	1,5*10 ⁴	0,15	1*10 ⁶	10	1,5*10 ⁵	1,5	0	0	7*10 ⁴	0,7	5*10 ⁵	5

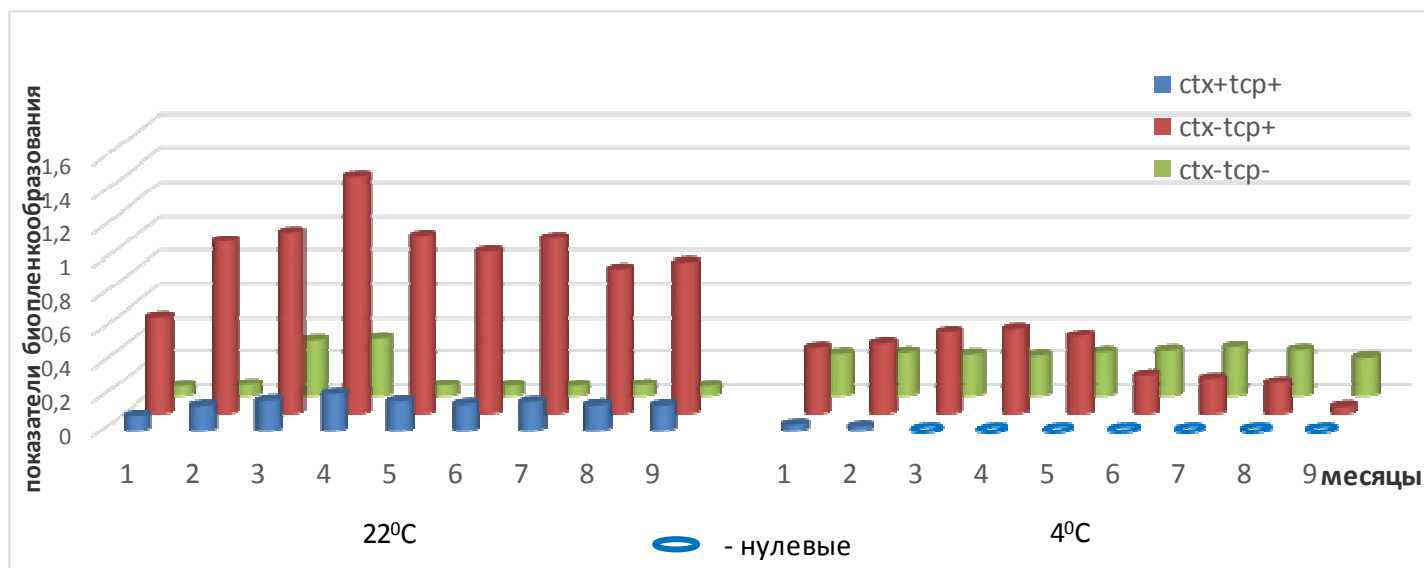


Рисунок 1. Сравнение уровней биопленкообразования у вибрионов Эль Тор в речной воде при 22⁰С и 4⁰С в течение 9 месяцев

У атоксигенных (ctx-tcp-) вибрионов, напротив, бóльшая часть популяции сохранялась при 4⁰С на протяжении всего срока исследования (к концу 9 месяца показатели биопленкообразования были выше, чем в тех же условиях при 22⁰С). То же касается и выживаемости – она была выше в холодной воде (5 % против 1,5 %).

Потенциально эпидемически опасные вибрионы (ctx-tcp+) сохранялись при обеих температурах на протяжении всего срока исследования, но продукция экзополисахарида была гораздо выше при 22⁰С. В процессе культивирования при 4⁰С уровень биопленкообразования этих штаммов несколько увеличивался к 4 месяцу, а затем существенно снижался. К концу 9 месяца при 22⁰С выживало 10 % популяции клеток (наиболее высокий показатель среды всех изучаемых вибрионов), при 4⁰С – всего 0,7 % (но это значение всего в 7 раз ниже, чем у нетоксигенных штаммов. Это свидетельствует о достаточно высоком персистентном потенциале ctx-tcp+ вариантов.

Для выяснения «судьбы» холерных вибрионов различной эпидемической значимости при попадании в речную воду в летнее время был проведен длительный эксперимент по моделированию условий пребывания в ней холерных вибрионов Эль Тор в летнее, осеннее, зимнее время при разных температурах (2 месяца – 22⁰С, 2 месяца – 10⁰С, 5 месяцев – 4⁰С). Результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 2

Средние значения выживаемости холерных вибрионов в речной воде при различных температурах в разные сроки

Наличие генов	Температура																	
	22 ⁰ C				10 ⁰ C				4 ⁰ C									
	Месяцы																	
	1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ctx+tcp+	2*10 ⁶	20	1,2*10 ⁵	1,2	6,1*10 ³	0,06	9*10 ¹	0,0009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ctx-tcp+	6,4*10 ⁶	64	5*10 ⁶	50	6,4*10 ⁵	6,4	5*10 ⁵	5	1,3*10 ⁵	1,3	8,2*10 ⁴	0,82	6*10 ⁴	0,6	4,4*10 ⁴	0,44	3,2*10 ⁴	0,32
ctx-tcp-	3*10 ⁶	30	2,5*10 ⁶	25	4*10 ⁵	4	4,6*10 ⁵	4,6	2*10 ⁵	2	2,8*10 ⁵	2,8	2,4*10 ⁵	2,4	2*10 ⁵	2	1,8*10 ⁵	1,8

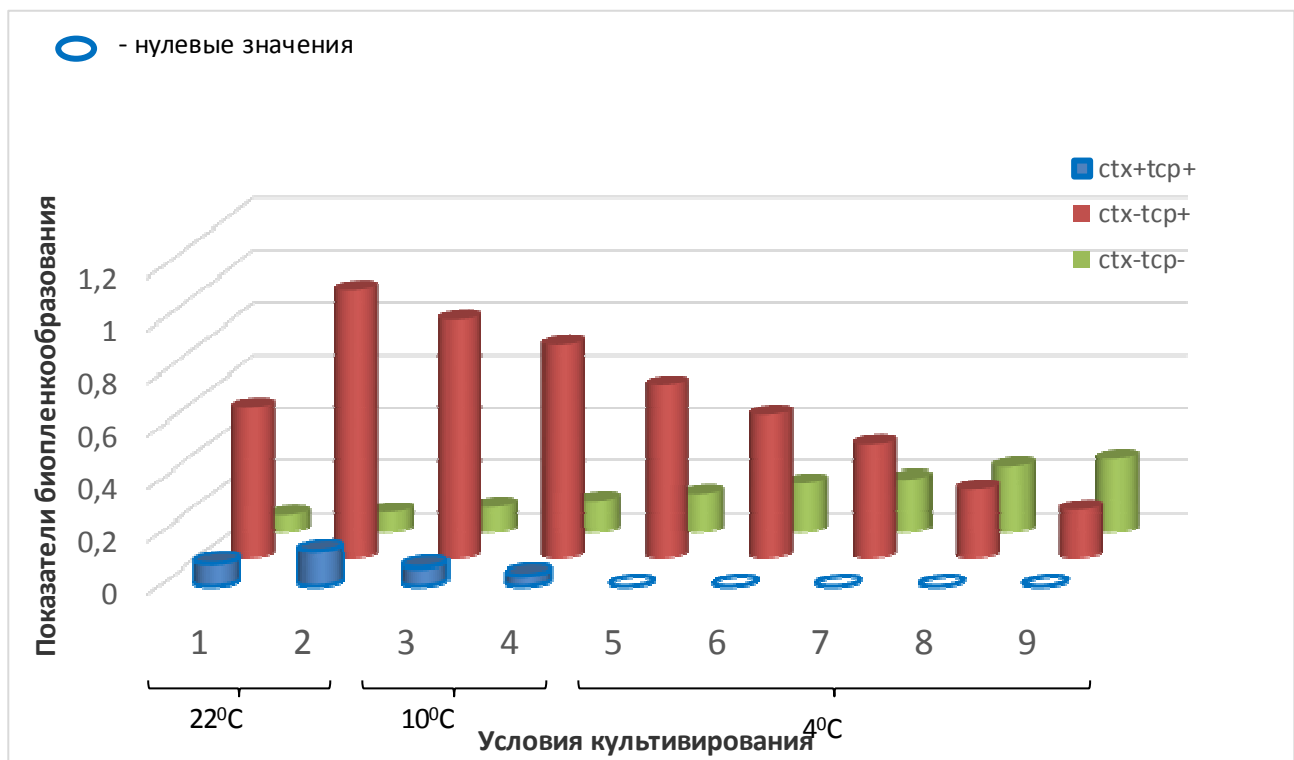


Рисунок 2. Биопленкообразование вибрионов Эль Тор в речной воде в течение 9 месяцев при изменении температуры культивирования

Токсигенные холерные вибрионы при постепенном снижении температуры выживали только при температурах 22 °C и 10 °C (при этом к концу 4 месяца высевалось лишь 0,0009 % клеток), при 4 °C живых клеток обнаружено не было. Снижение количества живых вибрионов в речной воде коррелировало со снижением показателей биопленкообразования (показатели ОП на всем протяжении были низкими, и после 4 месяцев были отрицательными, т.е. биопленки отсутствовали).

Атоксигенные штаммы сохранялись на протяжении всего эксперимента, хотя количество клеток к концу исследования было сравнительно невелико (0,8 % от исходного показателя). Что же касается биопленок, то их значения в этой группе штаммов к концу

исследования при 4 °С были выше, чем в начале эксперимента, вероятно, в результате адаптации к стрессовым условиям обитания.

Высоко устойчивыми к стрессу оказались потенциально эпидемически опасные штаммы, лишенные генов токсинообразования, но способными их приобрести при определенных условиях за счет токсинкорегулируемых пилей алгезии. Эти вибрионы выживали на протяжении всего срока исследования (хотя к концу эксперимента сохранилось всего 0,3 % планктонных клеток). На протяжении 7 месяцев персистирования в воде при разных температурах эти штаммы формировали самые «мощные» биопленки (показатели ОП – самые высокие), затем значения постепенно снижались.

Таким образом, можно констатировать, что эпидемически значимые токсигенные холерные вибрионы в условиях стерильной речной воды достаточно быстро (в течение 2–3 месяцев) погибают, гибель идет тем быстрее, чем ниже температура. Показатели выживания коррелируют с показателями биопленкообразования, т.к. stx+tcp+ варианты не формируют в условиях низкотемпературного стресса экзополисахарид. В речной воде с резкими колебаниями температуры в присутствии антагонистических факторов циркуляция токсигенных холерных вибрионов еще более ограничена. В эндемичных очагах холеры при высокой температуре речной воды персистенция токсигенных вариантов может быть достаточно длительной.

Непатогенные и условно эпидемически значимые вибрионы выживают в речной воде и сохраняют биопленки достаточно продолжительное время, что свидетельствует о выраженном персистентном потенциале.

Список литературы

1. Алексеева Л.П., Чемисова О.С., Мазрухо Б.Л., Шестиалтынова И.С., Михалева В.В., Татаренко О.А., Маркина О.В. К вопросу о способности холерных вибрионов эльтор продуцировать экзополисахарид // Холера и патогенные для человека вибрионы. – 2007. – № 20. – С. 77-80.
2. Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Подройкина В.А. Способность к формированию биопленок у холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины. – С.-Петербург, 2010. – С. 92-94.
3. Белобородова Н.В. Клиническое значение микробных биопленок // Российские медицинские вести. – 2010. – Т. XV, № 4. – С. 68-72.
4. 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. – Т. 40, № 11. – С. 1445-1456.
5. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Марамович А.С., Миронова Л.В., Саппо С.Г. Способность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп к образованию биопленки в эксперименте // Холера и патогенные для человека вибрионы. – 2009. – № 22. – С. 90-93.
 6. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Саппо С.Г., Миронова Л.В., Марков Е.Ю., Мальник В.В., Корзун В.М., Миткеева С.К., Балахонов С.В. Биопленка холерного вибриона: получение, характеристика и роль резервации возбудителя в водной окружающей среде // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2015. – № 1. – С. 3-11.
 7. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными пленками // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 4. – С. 268-275.
 8. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms // Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 7. – P. 167-193.
 9. Gander S. Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents // J. Antimicrob. Chemother. – 1996. – Vol. 37. – P.1047-1050.
 10. Yildiz F.H., Visick K.L. Vibrio biofilms: so much the same yet so different // Trends Microbiol. – 2009. – Vol. 17. – P. 109-118.

Рецензенты:

Терентьев А.Н., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории диагностики ООИ. ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону;

Павлович Н.В., д.м.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией туляремии ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону.