

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ОТ БОЛЬНЫХ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ И ИЗ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

^{1,2} Анганова Е.В., ^{1,2} Савилов Е.Д., ² Духанина А.В., ³ Ушкарева О.А., ⁴ Маркова Ю.А.,
^{1,2} Астафьев В.А., ⁵ Верхозина Е.В.

¹ ГБОУ ВПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава РФ, Иркутск, Россия (664049, Иркутск, м-н Юбилейный, 100), e-mail: eva.irk@mail.ru, astaw48@mail.ru

² ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия (664003, Иркутск, ул. Карла Маркса, 3), e-mail: eva.irk@mail.ru, astaw48@mail.ru

³ ФБУЗ «Центр гигиены и Эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)» Роспотребнадзора РФ, Якутск, Россия (677005, Якутск, ул. П. Алексеева, 60/2), e-mail: uho_75@mail.ru

⁴ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия (664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132)

⁵ Институт земной коры СО РАН, Иркутск, Россия (664033, ул. Лермонтова, 128), e-mail: verhel@crust.irk.ru

В статье приведены результаты изучения способности к биопленкообразованию у микроорганизмов, выделенных от больных кишечными инфекциями (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*), и у водных изолятов (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter spp.*). Всего проведено 282 исследования. Биопленкообразование определяли по способности к адсорбции кристалвиолета этанолом в единицах оптической плотности. Свойство формировать биопленки было выявлено у подавляющего большинства протестированных микроорганизмов: условно-патогенных возбудителей острых кишечных инфекций – 100,0%, сальмонелл – 84,2%, шигелл – 90,0%, водных изолятов – 67,7%. Установлено, что у штаммов, изолированных из кишечника человека, формирование биопленок значительно чаще ($p < 0,01$) и более активно идет при 37°C, а у водных штаммов – при температуре 24°C.

Ключевые слова: бактериальные биопленки, степень биопленкообразования, энтеробактерии, возбудители кишечных инфекций, водные изоляты, условия культивирования

BIOFILM BACTERIA ISOLATED FROM PATIENTS WITH INTESTINAL INFECTIONS AND FROM THE ENVIRONMENT

^{1,2} Anganova E.V., ^{1,2} Savilov E.D., ² A.V. Dukhanina, ³ Ushkareva O.A., ⁴ J.A. Markova,
^{1,2} V.A. Astafiev, ⁵ E.V. Verkhovina

¹ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk, Russia (664049, Irkutsk, mn Jubilee, 100), e-mail: eva.irk@mail.ru, astaw48@mail.ru

² Scientific Center of Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russia (664025, Irkutsk, street K.Marx, 3) e-mail: eva.irk@mail.ru, astaw48@mail.ru

³ Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russia (677005, Yakutsk, street P. Alekseeva, 60/2), e-mail: uho_75@mail.ru

⁴ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk Russia (664033, Irkutsk, street Lermontova, 132), e-mail: juliam06@mail.ru

⁵ Institute of the Earth's crust SB RAS, Irkutsk, Russia (664033, Irkutsk, street Lermontova, 128), e-mail: verhel@crust.irk.ru

The results of the study of the ability to formation of biofilm among microorganisms isolated from patients with enteric infections (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*) and microorganisms isolated from water (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter spp.*) are presented in article. 282 investigations were conducted. The ability to adsorb crystalviolet by ethanol in units of optical density was defined. The most of studied microorganisms are capable to forming biofilms: opportunistic Enterobacteriaceae – 100,0%, Salmonella spp. – 84,2%; Shigella spp. – 90,0%; microorganisms isolated from water – 67,7%. Microorganisms isolated from the intestine of human were capable to form biofilms is more often ($p < 0,01$) and more actively at 37 °C, microorganisms isolated from water – at 24°C.

Keywords: bacterial biofilms, degree of biofilm formation, Enterobacteriaceae, causative agents of enteric infections, aquatic isolates, conditions of cultivation

Учитывая, что биопленки обеспечивают бактериям большую устойчивость к неблагоприятным факторам воздействия по сравнению со свободно плавающими клетками [10], в ближайшие годы мишенью для воздействия на инфекционный и микробный процессы станут не только сами бактерии, но также и микробные биопленки [1, 3]. Биопленка — это специализированная экосистема, обеспечивающая жизнеспособность и сохранение составляющих ее видов микроорганизмов, а также увеличение их общей популяции. Изучение биопленок вызывает огромный интерес исследователей в последние годы в силу того, что этот способ существования бактерий создает большие проблемы в медицинской практике. В настоящее время считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в форме биопленок [5]. Способность к образованию биопленок была обнаружена у многих видов бактерий [2, 4, 7, 9]. Предполагается, что 90% изученных видов таксономического домена *Bacteria* способны формировать биопленки [10, 11]. И в водоемах, и на поверхности почвы, и в самых разных других областях, а тем более в организме человека микробы преимущественно существуют в виде биопленок. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Представления о биопленках, подтвержденные с помощью современных методов визуализации, изменили взгляды на инфекционные заболевания.

Цель исследования

Изучить способность к биопленкообразованию и степень его активности у энтеробактерий, выделенных из различных источников (от больных кишечными инфекциями и из окружающей среды).

Материалы и методы исследования

Способность формировать биопленки изучали у микроорганизмов (условно-патогенных и патогенных энтеробактерий), выделенных от больных кишечными инфекциями, а также водных штаммов, представленных бактериями семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pantoea agglomerans*) и неферментирующими грамотрицательными бактериями (*Acinetobacter spp.*). Всего проведено 282 исследования. Образование биопленок изучали с помощью определения способности штаммов энтеробактерий к адгезии на поверхности 96-луночной полистироловой панели. Микроорганизмы культивировали на мясопептонном бульоне (МПБ) при двух температурах (24°C и 37°C) в течение 48 ч. Из лунок панели удаляли планктонные клетки и окрашивали пленки. Для этого в лунку вносили 150,0 мкл дистиллированной воды и 20,0 мкл 1%-ного кристаллвиолета и инкубировали в течение 45 мин

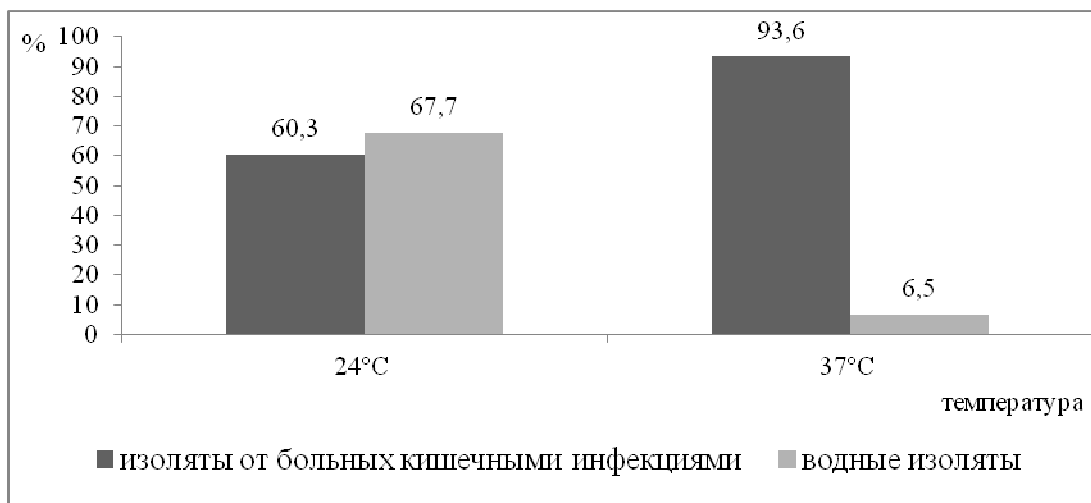
при комнатной температуре. После трехкратного промывания дистиллированной водой в лунки для экстракции краски из пленки добавляли 200,0 мкл 96%-ного этанола и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 492 нм. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени пленкообразования. Количественным выражением степени образования биопленок служили значения оптической плотности (ОП), измеряемые на спектрофотометре. Значимость различий полученных показателей определяли по критерию Стьюдента [6, 8].

Результаты исследования и их обсуждение

Свойство формировать биопленки было выявлено у подавляющего большинства протестированных изолятов. При этом условно-патогенные энтеробактерии (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Morganella morganii*), выделенные больными с кишечными инфекциями, в 100,0% случаев обладали способностью к образованию биопленочных сообществ. Среди шигелл и сальмонелл данное свойство выявлено в 90,0% и 84,2% случаев соответственно. Среди водных изолятов способность формировать встречалась реже: биопленкообразование было отмечено у 67,7% штаммов.

Проведенные исследования показали зависимость биопленкообразования от температурных условий. Так, микроорганизмы, выделенные из организма человека (от больных кишечными инфекциями), чаще образовывали биопленки при температуре, близкой к температуре тела человека. При культивировании при более низкой температуре способность штаммов энтеробактерий формировать биопленки снижалась. Тестирование штаммов на наличие данного признака показало, что у энтеробактерий, выделенных от больных с кишечными инфекциями, формирование биопленок более активно идет при температуре 37°C по сравнению с 24°C. Так, при температуре 24°C способность формировать биопленки выявлена у 60,3% штаммов микроорганизмов, при 37°C – у 93,6% изолятов. Различия носили значимый характер ($p < 0,05$). Данная закономерность выявлена как в отношении условно-патогенных энтеробактерий, так и в отношении патогенов — бактерий родов *Salmonella* и *Shigella*. Так, среди условно-патогенных энтеробактерий биопленкообразование при температуре 37°C установлено в 100,0% случаев, при 24°C — в 67,6% случаев, среди сальмонелл — в 84,2% и 57,9% соответственно. У шигелл способность к образованию биопленок при температуре 37°C также встречалась чаще, чем при 24°C (90,0% и 40,0% соответственно).

Водные изоляты, напротив, значимо чаще ($p < 0,01$) формировали биопленку при температуре 24°C. При повышении температуры до 37°C способность водных изолятов к образованию биопленок снижалась (рис.).



Способность к биопленкообразованию микроорганизмов, выделенных из разных источников, при культивировании при различных температурных условиях (%)

Среди водных штаммов *E. coli* свойство биопленкообразования установлено только при культивировании при температуре 24°C. Водные изоляты *Enterobacter spp.* при температуре 24°C обладали данным свойством в 50,0% случаев, при повышении температуры до 37°C встречаемость биопленкообразования снижалась до 12,5%. Аналогичная закономерность отмечена и у неферментирующих грамотрицательных бактерий: среди *Acinetobacter spp.* при 24°C формировали биопленку 66,7% изолятов, при температуре 37°C – 11,1% штаммов. Следующим этапом работы было изучение степени выраженности процесса биопленкообразования. Сравнение активности пленкообразования (по уровню адсорбции кристалвиолета этанолом) при культивировании в разных температурных условиях показало, что у штаммов, выделенных от больных кишечными инфекциями, при более высокой температуре активность, измеряемая в единицах оптической плотности, была выше при 37°C, чем при 24°C. Превышение оптической плотности пленкообразования в условиях культивирования при температуре 37°C по сравнению с более низкой температурой было отмечено в отношении большинства протестированных возбудителей кишечных инфекций: условно-патогенные энтеробактерии — 0,122 и 0,153 единиц ОП соответственно, *Salmonella enterididis* – 0,072 и 0,124 единиц ОП соответственно, у *Shigella flexneri* — 0,04 и 0,074 единиц оптической плотности соответственно. Следует обратить внимание, что у условно-патогенных энтеробактерий была выявлена более высокая плотность биопленок по сравнению с патогенами. Исследование биопленкообразования у водных штаммов бактерий при различных температурных условиях показало, что при более высокой температуре способность исследованных штаммов образовывать биопленки снижалась. При указанной температуре только две культуры обладали изучаемым

свойством: *E.aerogenes* и *Acinetobacter spp.* (0,032 единиц ОП). У всех других протестированных штаммов при температуре 37°C уровень адсорбции кристалвиолета этанолом в единицах оптической плотности соответствовал фону. Сравнение степени пленкообразования у указанных микроорганизмов при культивировании в разных температурных условиях показало, что при более низкой температуре (24°C) уровень адсорбции кристалвиолета этанолом был выше, чем при более высокой температуре (37°C).

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что большинство исследованных микроорганизмов, выделенных от человека (от больных острыми кишечными инфекциями), а также из окружающей среды (водные изоляты), способно к образованию биопленок. При этом у патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, возбудителей кишечных инфекций, формирование биопленочных сообществ значимо чаще наблюдалось в условиях культивирования при температуре 37°C; при более низкой температуре способность штаммов формировать биопленки снижалась. У водных изолятов, напротив, данное свойство чаще отмечалось при температуре 24°C. Аналогичная закономерность прослеживалась и в отношении активности биопленкообразования.

Список литературы

1. Анганова Е.В. Условно-патогенные энтеробактерии: доминирующие популяции, биологически свойства, медико-экологическая значимость: автореф. дис ... д-ра биол. наук: 03.02.03. — Иркутск, 2012. — 46 с.
2. Анганова Е.В., Савилов Е.Д., Ушкарева О.А., Аблов А.М., Духанина А.В. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биопленок // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2014. — № 5(99). — С. 34–37.
3. Афиногенова А. Г., Даровская Е.Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травматология и ортопедия России. — 2011. — № 3(61). — С. 119–125.
4. Веселова М.А. Изучение Quorum sensing систем регуляции у *Pseudomonas chlororaphis* и *Burkholderia seracida*: дисс. канд. биол. наук: 03.00.15. — М., 2008. — 154 с.
5. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. — 2010. — Т. 2. — № 3. — С. 4–1.
6. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
7. Маркова Ю.А., Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Войников В.К. Природная среда как потенциальное местообитание патогенных и условно-патогенных энтеробактерий. — Иркутск: РИО ГОУ ДПО ИГМАПО, 2013. — 144 с.

8. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ: методы статистической обработки материала. – Новосибирск: Наука-Центр, 2011. — 156 с.
9. Ушкарева О.В., Анганова Е.В., Духанина А.В., Верхозина Е.В. Способность водных изолятов к формированию биопленочных сообществ в различных условиях культивирования // Сибирский медицинский журнал. — 2014. — № 7. — С. 102–104.
10. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. — 1999. — V. 284. — P. 1318–1322.
11. Hall-Stoodley L. Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // Cell Microbiol. — 2009. — Vol. 11, № 7. — P. 1034–1043.

Рецензенты:

Зоркальцева Е.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой туберкулеза ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Иркутск;
Верхотуров В.В., д.б.н., профессор, зав.кафедрой технологии продуктов питания и химии, ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет», г. Иркутск.