УДК 579.843.1:579.26

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНОК IN VITRO С ПОМОЩЬЮ НОВОГО МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Титова С.В., Кушнарева Е.В.

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

На основе использования твердого субстрата (покровные стекла) разработан новый способ для изучения способности к формированию биопленок холерными вибрионами как III, так и II группы патогенности. Во всех экспериментальных системах регистрировались одни и те же стадии формирования холерными вибрионами биопленок на твердых субстратах. Проведено исследование биопленок с помощью прижизненного флуорохромирования от стадии обратимой адгезии до стадии сформированной биопленки. Использование сконструированного нами специального устройства позволяет проследить динамику образования биопленок в одной пробе, а также одновременно проводить микроскопию и получать рост культуры либо непосредственно из отпечатков на агаре, либо после обогащения в пептонной воде, что значительно повышает достоверность получаемых результатов. Экспериментальные данные свидетельствовали, что все 26 ctx^+ штаммов O1 и O139 серогруппы холерных вибрионов образовывали биопленки поэтапно. Адгезия к покровным стеклам (1–2 стадия) проходила в течение первых трех суток. Однако дальнейшие стадии биопленок проходили с разной скоростью. Отмечено, что, чем выше исходная концентрация холерных вибрионов в «планктоне», в нашем примере это 10^6 КОЕ/мл и выше, тем меньше вероятность микроскопически проследить за формированием 1–2 стадии адгезии.

Ключевые слова: штаммы холерных вибрионов, концентрация, биопленка, покровные стекла, пробы водных объектов

EVALUATION OF VIBRIO CHOLERAE ABILITY TO FORM BIOFILMS IN VITRO WITH THE USE OF THE NEW EXPERIMENTAL PROCEDURE

Titova S.V., Kusnaryova E.V.

Federal Governmental Health Institution «Rostov-on-Don Anti-Plague Institute» of the Federal Service on Supervision in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare of RF, Rostov-on-Don, e-mail: svetatitova@bk.ru

A new method based on the use of solid substrate (cover-glasses) was developed for investigating the ability for biofilm production by Vibrio cholerae of both III and II groups of pathogenicity. In all experimental systems the same stages of V. cholerae biofilm formation on solid substrates were recorded. The investigations of biofilms using intravital fluorochrome-labeling were carried out from the stage of reversible adhesion to the stage of completely formed biofilm. The use of special device designed by the authors made it possible to track out the dynamics of biofilm formation in one sample, as well as concurrently carry out the microscopy and obtain culture growth either directly by placing cover-glass on agar or after enrichment in peptone water, which significantly enhanced the reliability of results. The experimental data showed that all V. cholerae strains tested (26 ctx^+ strains of serogroups O1 and O139) were forming biofilms in a stepwise manner. Adhesion to cover-glasses (stages 1–2) took place within the first three days. However the next biofilm stages had different rates of formation. It was noted that the higher initial concentration of cholera vibrios in planktonic state (in this study 10^6 CFU/ml or more) lessened the possibility to follow the development of adhesion stages 1–2 by microscopy.

Keywords: Vibrio cholerae strains, concentration, biofilm, cover-glass, samples from water objects

Способность патогенных микроорганизмов к образованию биопленок является важнейшей составляющей не только их выживаемости в различных экологических нишах, но также механизмов передачи инфекции и колонизации организма хозяина [11, 2]. Способность факультативно патогенных для людей бактерий *Vibrio cholerae* формировать биопленки является ключевым фактором персистенции вибрионов в водных экосистемах; биопленки могут становиться источником новых вспышек холеры [7, 8] По этой причине более глубокое понимание процесса формирования биопленок имеет большое значение для борьбы с холерой. На сегодняшний день предложено несколько способов изучения биопленок *in vitro*. Самым распространенным является метод, основанный на использовании полистироловых планшетов с последующей окраской генцианвиолетом адгезированных к полистиролу сформировавших биопленку бактерий [4]. Количественный учет способности микроорганизмов к образованию биопленки проводят по фотометрическим показателям.

Другой подход состоит в применении пробирок из стекла или пластика (типа эппендорф) также с использованием для визуализации спиртового раствора генциан- либо кристалвиолета [4, 1]. Метод

позволяет визуально (качественно) оценить образование биопленки по наличию ободка на стенках пробирок.

В обоих случаях полученные биопленки практически не поддаются исследованию под микроскопом. Микроскопическое изучение биопленок, образовавшихся на других биотических (хитин, раковины моллюсков, натуральные почечные камни) и абиотических (камни, песок) поверхностях, возможно, но сопряжено с риском повреждения нативной структуры при искусственном отслаивании и приготовлении препаратов.

Наконец, предложено использовать в качестве подложки покровные стекла, расположенные на дне чашек Петри или флаконов, где в результате естественной адгезии клеток к стеклянной поверхности происходит формирование биопленок [10]. Анализ проводят с последующим извлечением стекол, отмывкой, фиксацией и окрашиванием генциан/кристалвиолетом [6, 4]. О формировании биопленок судят по пятнам на покровных стеклах и чашках Петри, а также по результатам их изучения под микроскопом. Этот способ показал хорошие результаты при изучении *Pseudomonas spp*., *Burkholderia spp*. (cepacia), *Stenotrophomonas, Staphylococcus aureus, Candida albicans и* др., т.е. микроорганизмов, относящихся к III–IV группам патогенности. Применение его к таким возбудителям II группы патогенности, как холерные вибрионы, крайне затруднено, поскольку при работе с ними необходимо соблюдать особые режимные условия согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II группы патогенности (опасности)». На этапах внесения культуры микроорганизмов в лунки полистироловых планшетов, снятия фотометрических результатов, извлечения стекол со дна флаконов повышается вероятность аварий с разбрызгиванием заразного материала.

В связи с этим **целью** настоящей работы явилась разработка оптимального способа получения биопленок микроорганизмов II группы патогенности (холерных вибрионов) на стекле в условиях эксперимента для последующих морфофункциональных исследований.

Материалы и методы исследования

В ходе отработки метода моделирования образования биопленок использовали два нехолерогенных (не содержащих генов холерного токсина *ctx AB*) штамма: *V. cholerae El Tor P-5392* и *V. cholerae O139 17918. В* дальнейшем, после завершения создания протокола, исследовали предлагаемым методом по 13 ctx^+ штаммов *V. cholerae* El Tor (5 штаммов водного происхождения и 8 – выделены от человека) и O 139 серогруппы. Все штаммы получены из музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, где они хранились в ампулах в лиофилизированном состоянии.

В качестве твердого субстрата использовали покровные стекла (20×20), средой инкубации служила стерильная водопроводная либо речная вода. Эксперименты проводили при комнатной температуре в 100 мл флаконах.

Для исследования в динамике адгезии клеток холерных вибрионов к покровным стеклам в динамике нами было сконструировано специальное устройство, в которое помещали до 9 покровных стекол в вертикальном положении (рис. 1). Устройство со стеклами устанавливали на дне флакона, затем наливали экспериментальные среды в объеме 30–40 мл до полного погружения покровных стекол. В каждую емкость вносили суспензии клеток холерных вибрионов, приготовленные из 18-часовых агаровых культур, до конечной концентрации от 10^1 до 10^8 мк/мл. В качестве контроля использовали те же суспензии, но без покровных стекол.

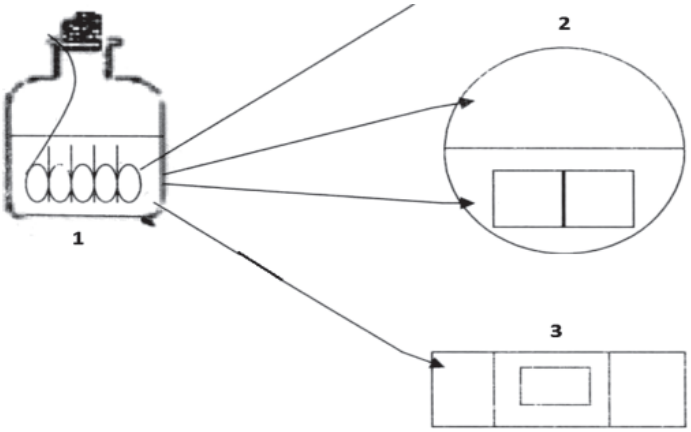


Рис. 1. Экспериментальная модель для изучения биопленок холерных вибрионов в динамике: 1 – стеклянная емкость, внутри которой размещено специальное устройство с покровными стеклами; 2 – чашка Петри с агаром для отпечатков на покровных стеклах и для высева планктонной культуры; 3 – предметное стекло, на которое помещены покровные стекла с биопленкой и накрыты покровным стеклом, большего размера (препарат раздавленная капля)

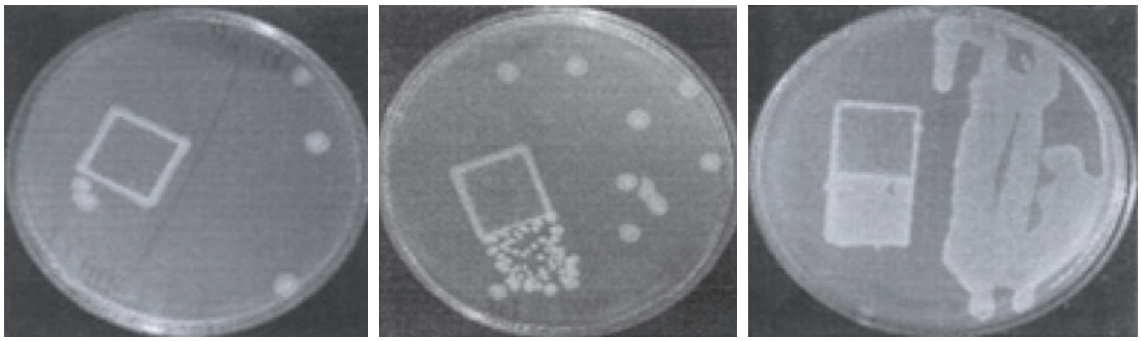
Для исследования динамики процесса адгезии клеток на поверхности покровных стекол, через определенные промежутки времени вынимали пинцетом по 2 стекла из каждой пробы, трехкратно промывали их в забуференном фосфатами физиологическом растворе (PBS) и в вертикальном положении помещали на листы фильтровальной бумаги для стекания с их поверхности оставшейся жидкости. После этого одно из стекол накладывали на поверхность агара Мартена и через 15 минут переворачивали на другую сторону, чашки с агаром помещали в термостат при 37 °С и на следующие сутки регистрировали наличие роста колоний холерных вибрионов в местах отпечатков. Второе стекло помещали на предметное стекло, добавляли раствор акридинового оранжевого (АО) в концентрации 20 мкг/мл (прижизненное флуорохромирование), накрывали покровным стеклом большего размера и исследовали методом люминесцентной микроскопии. Число адгезированных клеток определяли прямым подсчетом в ЛЮМ-микроскопе (МЛД-1) при увеличении 90×7.

Параллельно из опытных и контрольных образцов отбирали аликвоты суспензии («планктонная проба») и определяли в них концентрацию холерных вибрионов высевом десятикратных разведений на пластины агара Мартена с последующим подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ).

Все способы моделирования проводились согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II группы патогенности (опасности)».

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы были использованы взвеси холерных вибрионов в концентрации 10^1–10^2 м.к./мл. Рис. 2 визуально иллюстрирует прямо пропорциональную зависимость между экспозицией нахождения покровных стекол (4, 10, 20 ч) в опытных пробах, концентрацией холерных вибрионов в образовавшихся биопленках (отпечатки) и в планктонной части проб (изолированные колонии и сливной рост).



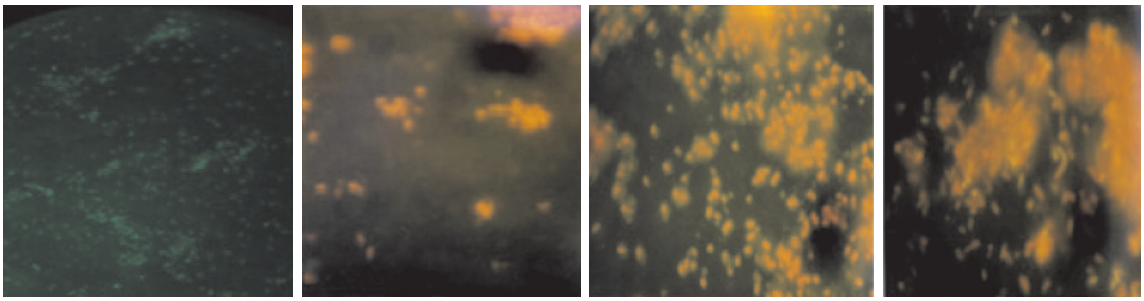
через 4 часа | через 10 часов | через 20 часов

Рис. 2. Результаты отпечаток на агаре Мартена покровных стекол и высевов планктонной части культуры холерных вибрионов (V. cholerae El Tor P-5392)

С первого дня эксперимента холерные вибрионы адгезировались на поверхности покровных стекол в виде отдельных клеток, цепочек и небольших скоплений. Возможно, эта стадия соответствует стадии 1, описанной в литературе, когда твердая поверхность покрывается первичной пленкой, или как стадия 2 – собственно микробная адгезия, когда микроорганизмы обратимо прикрепляются к твердой поверхности (рис. 3, а, б). Взаимодействие структур на поверхности микроорганизмов и твердого субстрата обусловлено, по-видимому, неспецифическими физико-химическими силами [13, 3]. Нельзя исключить и определенной роли двигательной активности холерных вибрионов, поскольку подвижные клетки активно перемещаются по направлению к поверхностям и окончательно удерживаются притягивающими силами, действующими вблизи поверхности [9].

Исследования в динамике показали, что к четвертым суткам на покровных стеклах скопления состояли из клеток с сохраненной подвижностью, а также скоплений из слипшихся друг с другом клеток, между которыми находилось аморфное вещество, по-видимому, это экзополисахарид, такие структуры занимали всю площадь покровных стекол (рис. 3, в). Описанная картина, согласно литературным данным, характеризует третью стадию, в свою очередь, состоящую из нескольких этапов и по времени занимающую от нескольких часов до четырех суток [12, 14]. Клетки сохраняют способность к передвижению по поверхности стекла и формируют внеклеточный матрикс. Затем клетки холерных вибрионов склеиваются друг с другом, образуя скопления разных размеров, расположенные в один слой. В этот период обратной адгезии клеток не происходит, об этом

свидетельствует уменьшение свободных мест на покровных стеклах. Образование матрикса – между клетками способствует их склеиванию друг с другом и образованию слоев, из которых формируются объемные фигуры.



а б в г

Рис. 3. Оценка формирования на покровных стеклах биопленок холерных вибрионов на разных стадиях V. cholerae El Tor P-5392 (увеличение 7×90, окраска АО 20 мкг/мл): а – 1 стадия; б – 2 стадия; в – 3 стадия; г – 4 стадия

Начиная с пятых суток исследования процесс образования многослойной/многомерной структуры продолжался. Четкие очертания клеток были видны в каждом отдельном слое, а в случае многослойности они выглядели «размытыми». Клетки были окружены аморфным веществом, представляющим, вероятно, матрикс, состоящий из полисахаридов, белков, липополисахаридов, гликопротеинов или полипептидов, которыми обеспечивается прочность связи бактериальных клеток с поверхностями, благодаря увеличению числа точек контакта [5]. Между скоплениями просматривались пустые места в виде дорожек (рис. 3, г).

Аналогичное описание приводится в литературе, как 4 стадия – вторичных колонизаторов. Микроорганизмы прикрепляются к тем, которые уже сформировали биопленку, на этой же стадии формируются полости, каналы, выросты, поры [15].

Продолжение исследований позволило установить, что в течение следующих двух месяцев микроскопические препараты отличались количеством скоплений клеток и их ростом, как в ширину, так и в высоту, между скоплениями образовывались свободные места в виде дорожек. В планктонной части опытных и контрольных проб концентрация холерных вибрионов через два месяца от начала эксперимента снизилась на два порядка и составляла 10^4 КОЕ/мл.

Экспериментальные данные свидетельствовали, что все токсигенные штаммы холерных вибрионов образовывали биопленки поэтапно. Адгезия к покровным стеклам (1–2 стадия) проходила в течение первых трех суток. Однако дальнейшие стадии биопленок проходили с разной скоростью. Формирование скоплений и вещества между клетками (третья стадия), с последующим формированием дорожек и многослойности (4 стадия) в основном (у 14 штаммов из них 8 – *V. cholerae El Tor и* 6 – *V. cholerae O139)* наблюдалось на 4–7 сутки. Исключение составили штаммы, сформировавшие биопленку четвертой стадии к третьим суткам (*V. cholerae El Tor 18210 и V. cholerae O139 17259).* Штаммы, не сформировавшие к 21 дню (срок наблюдения) четвертую стадию биопленки, *V. cholerae El Tor 18336* и *V. cholerae O139 16064, 16486, 16070. У* штамма *V. cholerae El Tor 18337* произошла только стадия адгезии. Ряд штаммов образовал четвертую стадию биопленки на второй неделе: *V. cholerae El Tor 18335, 18338* и *V. cholerae O139 16485, 16073 и* один штамм на третьей неделе *V. cholerae O139 16075.* В течение срока наблюдения пятой стадии (регрессии биопленки) не наблюдалось.

На втором этапе мы увеличили концентрацию холерных вибрионов до 10^6–10^8 м·кл./мл.

Для исследования динамики процессов не только адгезии холерных вибрионов к поверхности покровных стекол, но и их размножения в планктонной пробе, через 6, 9, 24, 48 часов, далее 1 раз в неделю, 1 раз в месяц исследовали покровные стекла, как описано выше, и делали высевы по 0,1 мл на пластины с агаром Мартена.

Начиная с 6 часов (начальный срок наблюдения) покровные стекла, извлеченные из всех проб, были покрыты налетом и выглядели мутными. Эти данные позволили предположить, что первая стадия образования биопленки происходит сразу после внесения культуры микроорганизмов. В микроскопических препаратах присутствовали подвижные и неподвижные палочковидные клетки зеленого и оранжевого цветов, цепочки клеток и скопления из 4–10 клеток. Как было отмечено выше, это вторая стадия – собственно микробная адгезия, когда

микроорганизмы обратимо прикрепляются к твердой поверхности. В конце первой недели во всех экспериментальных пробах биопленки соответствовали 3–4 стадиям, в течение второй недели во всех исследуемых пробах – четвертой стадии.

В «планктонных» пробах с начальной концентрацией 10^8 КОЕ/мл количество холерных вибрионов через две недели от начала эксперимента снизилось на два порядка, с начальной концентрацией 10^7 КОЕ/мл – на один порядок и осталось без изменений в пробах с начальной концентрацией 10^6 КОЕ/мл, снижение КОЕ произошло через три недели на порядок. Соотношение КОЕ в экспериментальных и контрольных пробах без покровных стекол было в пределах одного порядка.

В течение второго и к концу третьего месяцев (срок наблюдения) концентрация холерных вибрионов в планктонных пробах, как в экспериментальных, так и в контрольных, оставалась в пределах $2{\cdot}10^5$–$4{\cdot}10^6$ КОЕ/мл. На покровных стеклах в этот же период биопленки сохраняли свою многомерную/многослойную структуру с пустыми местами в виде дорожек.

Концентрация клеток холерных вибрионов в биопленках, формирующихся на покровных стеклах во всех экспериментальных пробах, не поддавалась подсчету, так как в отпечатках покровных стекол на пластинах агара Мартена наблюдался сливной рост.

Таким образом, при использовании разработанного нами способа во всех экспериментальных системах регистрировались одни и те же стадии формирования холерными вибрионами биопленок на твердых субстратах:

1. Адгезия клеток холерных вибрионов на поверхности покровных стекол.
2. Последовательное формирование скоплений клеток.
3. Изменение соотношения между единично адгезированными клетками и скоплениями клеток в сторону последних.
4. Формирование матрикса клетками холерных вибрионов в скоплениях.
5. Увеличение скоплений в ширину и в высоту и формирование пустых мест в виде дорожек.

Необходимо также отметить, что, чем выше исходная концентрация холерных вибрионов в «планктоне», в нашем примере это 10^6 КОЕ/мл и выше, тем меньше вероятность микроскопически проследить за формированием 1–2 стадии адгезии. Так как размножение холерных вибрионов, если и происходит, то из-за отсутствия свободного объема в планктонной части, возможно, происходит вынужденная адгезия к поверхностям.

Заключение

Итогом проведенных исследований является разработка способа для изучения способности к формированию биопленок холерными вибрионами как III, так и II группы патогенности. Предлагаемая схема исследования соответствует режимным требованиям и сводит к минимуму риск контаминации возбудителем окружающего пространства. Кроме того, использование сконструированного нами специального устройства позволяет проследить динамику образования биопленок в одной пробе, а также одновременно проводить микроскопию и получать рост культуры либо непосредственно из отпечатков на агаре, либо после обогащения в пептонной воде, что значительно повышает достоверность получаемых результатов.

Список литературы/References

1. Kulikalova E.S. Sposobnost kholernykh vibrionov O1 i O139 serogrupp k obrazovaniu bioplenok v eksperimente // Kholera I patogennye dlya cheloveka vibriony: Mater.probl. komis. 2009. Vyp. № 22. P. 90–92.

2. Polyakova E.M., Bozhkova S.A., Krasnova M.V. Fenotipicheskie I genotipicheskie aspekty bioplenkoobrazovaniya u shtammov S. aureus osnovnikh vozbuditeley implant-assotsiirovannikh infektsiy // Mater. VI ezhegod. Vseros. Kongr. po inf. Boleznyam. Moskva, 2014. P. 247–248.

3. Railkin A.I. Protsesy kolonizatsii I zaschita ot bioobrastaniya. SPb., 1998. 272 p.

4. Romanova Yu.M. Sposobnost k formirovaniyu bioplenok v iskusstvennykh sistemakh u razlichnykh shtammov *Salmonella tiphimurium* // Zhurn. mikrobiol.,epidemiol. i immunobiol. 2006. № 4. P. 38–42.

5. Smirnova T.A. Strukturno-funktsionalnaya kharakteristika bakterialnykh bioplenok // Mikrobiologiya. 2010. T.79. № 4. P. 435–446.

6. Tets G.V. Vliyanie ekzogennykh proteoliticheskikh fermentov na peredachu plazmidnykh genov v smeshannykh bakterialnykh bioplenkakh // Antibiotiki I khimioterapiya.2009. T. 54. № 9–10. P. 3–5.

7. Alam M., Sultana M., Nair G.B. et all Toxigenic Vibrio cholerae in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, № 4. P. 2849–2855; 97.

8. Hall-Stoodley Z., Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens // Trends Microbiol. 2005. Vol. 13. № 7–10.

9. Marschall K.C. Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces // Bacterial adhesion (mechanisms and physiological significance) / Eds. Savage D.C., Fletcher M.NY-L.: Plenum Press, 1985. P. 133–155.

10. Mitik-Dineva N., Wang J., Mocanasu R.C. et al. Impact of nano-topography on bacterial attachment // Biotechnol. J. 2008, Vol. 3. P. 536–544.

11. O"Toole G.A., Kalpan H., Kolter R. Biofilm formationas microbial development// Ann.Rev. Microbiol. 2000. Vol. 54. P. 49–79.

12. O"Toole G.A., Kolter R. Flagellar and twitching motilitu are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 30. P. 295–304.

13. Van Loosdrecht M.C.H. Bacterial Adhesion. Wageningen, 1988. 200 p.

14. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm // Mol. Microbiol. 1999. Vol. 34. P. 586–595.

15. Watnick P.I., Lauriano C.M., Klose K.E., Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139 // Mol. Microbiol. 2001. Vol. 39(2). P. 223–35.

Рецензенты:

Алексеева Л.П., д.б.н., профессор, руководитель группы гибридов, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону;

Водопьянов С.О., д.м.н., заведующий лабораторией биохимии микробов, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 16.09.2014.