

УДК 579.841.1:579.262:57.017.22

О.Б. Балко, Л.В. Авдєєва

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна*

СТРУКТУРНІ КОМПОНЕНТИ І ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Досліджено особливості структурної організації бактеріальної біоплівки в процесі її формування і деградації на моделі тестового штаму *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (АТСС 9027). Показано, що розвиток біоплівки в стаціонарній системі на склі є двовекторним процесом із змінами в часовому та просторовому інтервалі. Формування біоплівки *P. aeruginosa* УКМ В-900 відбувається з окремих клітин, проходить стадії базових компонентів, сітчастої структури та острівків і завершується утворенням суцільного моношару. Деградація біоплівки відтворює процес її формування у зворотному порядку.*

*Ключові слова: біоплівка, *Pseudomonas aeruginosa*, формування і деградація, структурна організація.*

Бактерії виду *Pseudomonas aeruginosa* є опортуністичними патогенами людини, які у складі біоплівки можуть викликати у пацієнтів із ослабленою імунною системою різні нозологічні форми гнійно-запальних захворювань із важким перебігом та високою летальністю [6, 8]. Дані мікроорганізми здатні контамінувати зовнішні та внутрішні поверхні катетерів, зондів, дихальних трубок, контактних лінз і формувати на них біоплівку. У складі біоплівки бактеріальні клітини захищені від дії імунологічних факторів захисту, а також антимікробних агентів, що є суттєвою проблемою при етіотропній терапії інфекційних ускладнень [10]. Крім того, утворення біоплівки надає бактеріальній популяції нових, подекуди невідомих властивостей, які можуть не проявлятися у планктонній формі [3, 5]. Слід зазначити, що широкомасштабне дослідження морфології біоплівки *P. aeruginosa*, механізмів її утворення та деградації, особливостей формування за різних умов та впливу різних факторів знаходяться лише на етапі становлення [7]. Підвищений інтерес до вивчення біоплівки цих клінічно значимих

© О.Б. Балко, Л.В. Авдєєва, 2010

бактерій обумовлено ще й тим, що *P. aeruginosa* розглядають як один із основних модельних об'єктів для дослідження загальних закономірностей функціонування мікроорганізмів у складі біоплівки [11].

Тому, метою нашого дослідження було вивчення особливостей структурної організації бактеріальної біоплівки *P. aeruginosa* в процесі її формування і деградації.

Матеріали і методи. Дослідження процесу утворення біоплівки проводили на моделі тестового штаму *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (АТСС 9027). Етапність утворення біоплівки вивчали в стаціонарній системі на склі. Для цього в бюкси діаметром 30 мм, високою 50 мм і об'ємом 20 мл вносили покрівельні скельця стандартних розмірів (18×18 мм) та 2 мл 18–24 годинної культури титром близько 2×10^8 КУО/мл. Інкубування здійснювали від 10 хв до 10 діб при 37°C. Скельця відбирали у різні проміжки часу, тричі промивали у 0,9 % розчині NaCl, фіксували 10 хв у 96 % етиловому спирті, висушували на повітрі і протягом 10–15 хв. забарвлювали розчином генціан-віолету. Дослідження особливостей формування біоплівки проводили шляхом світлової мікроскопії на мікроскопі Micromed XS-2610 при 400-кратному збільшенні із наступним ультрамікрофотографуванням за допомогою цифрового фотоапарата Nikon Coolpix 5100. Обробку результатів та їх аналіз здійснювали за допомогою програм для роботи із растровою графікою Adobe Photoshop v. 7.0 і TotalLab v 2.01.

Результати та їх обговорення. Процес формування біоплівки розпочинається із прикріплення бактерій до поверхні скла [1]. В проведених нами дослідженнях було встановлено, що сорбовані на склі клітини досліджуваного штаму характеризувались середньою товщиною 0,74 мкм і довжиною близько 1,5 мкм. В свою чергу, товщина і довжина бактерій даного штаму у планктонній формі становили 0,73 і 2,0 мкм, відповідно. Отже, в даному випадку після прикріплення клітин до скла спостерігалася тенденція до їх укорочення.

Вихідним етапом формування біоплівки було об'єднання окремих сорбованих клітин у певні послідовності. Встановлено, що даний процес протікав із одночасним утворенням структур трьох типів – тяжів, розеток і конгломератів. Слід відмітити, що дані структури виявлялись на усіх етапах формування та деградації біоплівки і тому розглядалися нами як її базові компоненти. Тяжі являли собою довгі батогаподібні утвори, середньою товщиною 0,74 мкм і довжиною близько 15 мкм, хоча в окремих випадках їх розміри сягали 30 мкм (рис. 1 А). Дані структури, очевидно, формувались шляхом злиття окремих клітин полярними поверхнями. Свідченням цього може бути наявність в деяких утворах такого типу фрагментів незавершеного об'єднання, де між окремими клітинами все ще виявлялись незначні проміжки. Утворенню тяжів передувала поява коротких ланцюжків із 2–10 укорочених клітин середньою довжиною 8,5 мкм, які могли бути їх попередниками. Слід відмітити, що при ширині 0,73 мкм середня довжина окремих клітин в структурі ланцюжків становила 1,32 мкм, а клітин у складі тяжів – 1,1 мкм. Отже, при формуванні структур вищого порядку даного типу, очевидно, спостерігається тенденція до укорочення клітин, із яких вони побудовані. Хоча, на даному етапі досліджень слід зважати на ймовірність похибки вимірювань, пов'язаної із двовимірним зображенням сферичної біоплівки.

Іншими структурами, які виявлялись на початковому етапі формування біоплівки були розеткоподібні утвори – бактеріальні клітини, з'єднані між собою одним із кінців (рис. 1 Б). В результаті такого об'єднання із двох клітин формувались структури типу латинської букви V, трьох – Y, чотирьох – X. Слід відмітити, що в більшості випадків розетки були утворені двома або трьома клітинами. При цьому, двокомпонентні утвори становили 55 %, трикомпонентні – 35 %, а чотири- та багатокомпонентних розеток виявлялось не більше 10 % від усіх структур даного типу. Середні значення довжини окремих клітин зазначених утворів були близькими до відповідних параметрів клітин планктонної форми досліджуваного штаму і становили 1,8 мкм.

Третіми, базовими компонентами біоплівки були конгломерати (рис. 1 В). Останні являли собою структури неправильної форми, утворені, ймовірно, шляхом об'єднання боковими поверхнями потовщених клітин та їх наступної часткової модифікації. Вказані клітини середньою товщиною близько 1,2 мкм та довжиною 1,8 мкм передували появі конгломератів і були, очевидно, їх попередниками. Слід відмітити, що середня площа конгломератів становила 7,5 мкм², тоді як відповідні показники для поодиноких клітин *P. aeruginosa* виявляються в межах 0,75 – 2,4 мкм².

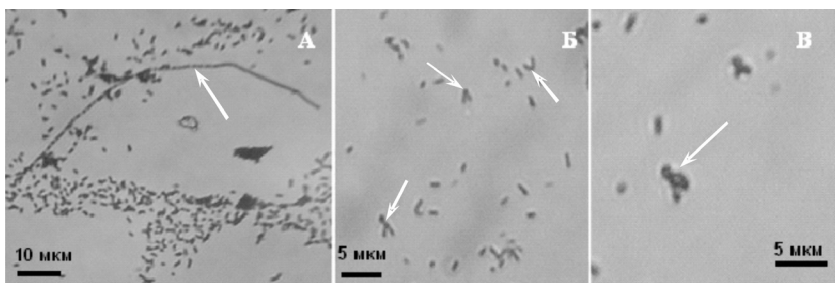


Рис. 1. Базові структурні компоненти біоплівки: тяжі (А), розеткоподібні структури (Б), конгломерати (В). Тут і далі стрілками вказані відповідні утвори.

Відомо, що факторами адгезії бактеріальних клітин можуть бути джгутики, пілі, білки-адгезини клітинної стінки та полісахариди [4]. Клітини бактерій виду *P. aeruginosa* характеризуються наявністю усіх зазначених компонентів [2]. Виходячи із особливостей структурної організації основних компонентів біоплівки зроблено припущення, що при формуванні тяжів об'єднання клітин відбувається за допомогою полярно розташованих пілей. При утворенні розеток основним фактором адгезії, на нашу думку, можуть бути джгутики, а при формуванні конгломератів – білки-адгезини або полісахариди.

На наступному етапі утворення біоплівки спостерігали взаємне об'єднання тяжів, розеток і конгломератів, а також вільно розташованих клітин у структури більших розмірів. При цьому, проміжки між окремими утворами зменшувались, добавлялися нові компоненти і, таким чином, формувалась певна сіткоподібна структура (рис. 2). Остання характеризувалася тим, що більшість її компонентів виявлялися зв'язаними між собою, проте кожний утвір можна було візуально відрізнити від іншого. В певних точках даної структури навколо конгломератів спостерігався процес подальшого групування клітин. В результаті формувалися ділянки інтенсивно забарвленого ущільнення середньою площею близько 20 μm^2 . Дані утвори були позначені нами як попередники острівків біоплівки. Навколо останніх спостерігалася поява речовини, менш інтенсивно забарвленої порівняно із наявними структурами. В даному випадку, очевидно, відбувалося виділення бактеріальними клітинами екзополісахаридів, активними продуцентами яких є *P. aeruginosa* [9].

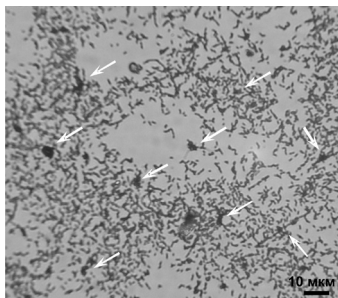


Рис. 2. Сформована сіткоподібна структура і початок перетворення конгломератів у попередники острівків біоплівки

Подальше об'єднання клітин та інших базових утворів навколо попередників острівків призводило до збільшення ділянок ущільнення і, відповідно, зменшення простору між окремими компонентами біоплівки. Утворені таким чином компактні угруповання бактеріальних клітин характеризувались наявністю певної структурної організації і були нами позначені як острівки біоплівки (рис. 3). Останні, в процесі формування біоплівки, збільшувались в розмірах і тому були поділені на мілкі, площею близько 90 μm^2 та великі – в середньому 320 μm^2 . Вищий рівень організації острівків біоплівки порівняно із їх попередниками полягав у наявності сформованої структури, в якій клітини і полісахаридний матрикс формували єдине цілісне об'єднання. При цьому, візуально виділити окремі утвори, які входили до їх складу виявлялося доволі складно або неможливо. Таким чином можна відмітити, що процес утворення зрілої біоплівки розпочинався одночасно в багатьох центрах і протікав у напрямку до їх об'єднання.

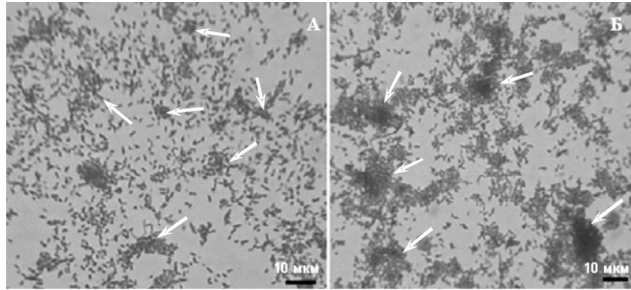


Рис. 3. Мілкі (А) та великі (Б) острівки біоплівки

На кінцевому етапі формування біоплівки спостерігали злиття близько розташованих острівків у великі блоки, які надалі трансформувались у неповний, а потім у суцільний моношар (рис. 4). Останній являв собою суцільну, практично однорідну структуру, обмежену лише полем зору. У складі неповного моношару, натомість, все ще виявлялись вільні від біоплівки зони, що дозволяло розрізнити окремі великі комплекси середніми розмірами близько $0,1 \text{ мм}^2$.

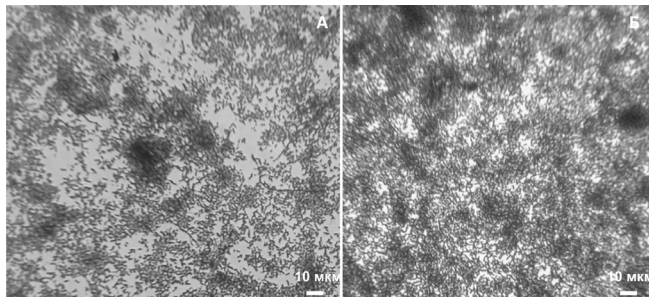


Рис. 4. Неповний (А) та суцільний (Б) моношар біоплівки.

Після накопичення максимальної кількості біомаси спостерігався процес деградації біоплівки, який проходив усі етапи її формування у зворотному порядку. В результаті суцільний моношар перетворювався у неповний моношар, який розпадався на окремі блоки острівків. Останні розщеплялись на великі та мілкі острівки біоплівки, а ті, в свою чергу, трансформувались у сіткоподібну структуру із конгломератів, тяжів і розеток. Характерними особливостями процесу деградації була поява у складі біоплівки таких компонентів як тіні клітин і вільний, не зв'язаний із клітинними утворами полісахаридний матрикс. При цьому, наявні на вказаних етапах структури біоплівки забарвлювались генціан-віолетом менш інтенсивно порівняно із такими на етапі формування біоплівки. Це призводило до появи у забарвленні відповідних структур рожевого відтінку. Завершувався процес деградації біоплівки частковим, а в подальшому і повним розщепленням конгломератів, тяжів і розеток до окремих бактеріальних клітин.

Слід зазначити, що розвиток біоплівки в стаціонарній системі на склі виявився двовекторним процесом. Так, було показано, що утворення і деградація описаних структур відбувалося не лише послідовно із зміною часу, але й у певному просторі. Інтенсивність розвитку біоплівки змінювалась у напрямку від периферії скелець до їх центру. При цьому, максимально швидкий розвиток біоплівки було відмічено біля країв із сповільненням даного процесу при наближенні до їх центральної частини. Дане явище пов'язувалося нами із рівнем доступності для бактерій поживних речовин та здатністю до ефективного виведення продуктів метаболізму. Таким чином, одночасне спостереження різних етапів еволюції біоплівки в одній системі додатково свідчить про правомірність описаного процесу формування та деградації біоплівки бактеріями *P. aeruginosa* УКМ В-900. Необхідно зазначити, що структури, схожі до описаних нами базових компонентів, попередників та острівків біоплівки були виявлені в роботах ряду авторів [7, 12, 14], а припущення стосовно гетерогенності формування біоплівки у часі та просторі висловлювалось також іншими дослідниками [13, 15].

В результаті проведених досліджень було розроблено загальну модель та виділено окремі етапи формування/деградації біоплівки бактеріями *P. aeruginosa* УКМ В-900. Показано, що розвиток біоплівки в стаціонарній системі на склі є двовекторним процесом, зміни в якому відбуваються у часовому та просторовому інтервалі. Формування біоплівки *P. aeruginosa* УКМ В-900 відбувається із окремих клітин, проходить стадії базових компонентів, сітчастої структури та острівків і завершується утворенням суцільного моношару. Деградація біоплівки відтворює процес її формування у зворотному порядку. На протікання процесу деградації вказує часткове знебарвлення структур біоплівки та поява у її складі таких додаткових компонентів як тіні клітин і вільний полісахаридний матрикс. Повна деградація біоплівки *P. aeruginosa* УКМ В-900 закінчується її розщепленням до мінімальних структурних компонентів – окремих клітин.

А.Б. Балко, Л.В. Авдеева

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ И ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ БИОПЛЕНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Резюме

Особенности структурной организации бактериальной биопленки в процессе ее формирования и дегградации изучено на модели тестового штамма *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027). Показано, что развитие биопленки в стационарной системе на стекле является двувекторным процессом, протекающим с изменениями во временном и пространственном интервале. Формирование биопленки *P. aeruginosa* УКМ В-900 осуществляется из отдельных клеток, проходит стадии базовых компонентов, сетчатой структуры, островков и завершается образованием сплошного монослоя. Дегградация биопленки повторяет этапы её образования в обратном порядке.

Ключевые слова: биопленка, *Pseudomonas aeruginosa*, формирование и дегградация, структурная организация.

A.B.Balko, L.V.Avdeeva

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

STRUCTURAL COMPONENTS AND PECULIARITIES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM ORGANIZATION

S u m m a r y

Peculiarities of the structural organization of bacterial biofilm during its formation and disintegration have been investigated on the model of *Pseudomonas aeruginosa* UCM B-900 (ATCC 9027). It was shown, that development of the biofilm in a stationary system on glass was a two-vector process with changes in time and space. *P. aeruginosa* UCM B-900 biofilm is formed from single cells, passes through the stages of base components, net structure, islands and comes to the end with integration into a complete monolayer. The biofilm degradation repeats the stages of its formation in the reverse sequence.

The paper is presented in Ukrainian.

К е y w o r d s: biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, formation and degradation, structural organization.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Balko A.B. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP D03680, Ukraine.

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – 76, № 2. – С. 149–163.
2. Смирнов В.В., Кирпанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Київ: Наукова думка, 1990. – 264 с.
3. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. et al. Microbial biofilms // Annu. Rev. Microbiol. – 1995. – 49. – P. 711–745.
4. Donlan R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – 8, N 9. – P. 881–890.
5. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // Nat. Rev. Micro. – 2007. – 5, N 1. – P. 48–56.

6. *Lyczak J.B., Cannon C., Pier G.B.* Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* – infection: lessons from a versatile opportunist // *Microb. Infect.* – 2000. – **2**, N 9. – P. 1051–1060.
7. *Ma L., Conover M., Lu H. et al.* Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // *PLoS Pathog.* – 2009. – **5**, N 3. – P. 1–11.
8. *Ramsey D.M., Wozniak D.J.* Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis // *Mol. Microbiol.* – 2005. – **56**, N 2. – P. 309–322.
9. *Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J.* Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – **10**, N 6. – P. 664–648.
10. *Singh P.K., Schaefer A.L., Parsek M.R., Moninger T.O., Welsh M.J., Greenberg E.P.* Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms // *Nature.* – 2000. – **407**, N 6805. – P. 762–764.
11. *Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W.* Biofilms as complex differentiated communities // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – **56**. – P. 187–209.
12. *Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle et al.* Optical sectioning of microbial biofilms // *J. Bacteriol.* – 1991. – **173**, N 20. – P. 6558–6567.
13. *Donlan R.M.* Biofilms: Microbial life on surfaces // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – **8**, N 9. – P. 881–890.
14. *O'Toole G.A., Kolter R.* Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // *Mol. Microbiol.* – 1998. – **30**, N 2. – P. 295–304.
15. *Stewart P.S., Peyton B.M., Drury W.J., Murga R.* Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – **59**, N 1. – P. 327–329.

Отримано 20.04.2009