

УДК 576.8.095.38:576.893.1

**РОЛЬ АССОЦИАЦИИ ПРОСТЕЙШИХ TETRAHYMENA
PYRIFORMIS И БАКТЕРИЙ BURKHOLDERIA CEPACIA
В ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНОК**

А.А. Каминская, В.И. Пушкарева, С.А. Ермолаева,

Т.В. Степанова, Н.В. Алексеева, А.Л. Андреев

*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва*

Почвенные и водные биоценозы включают популяции прокариотических и эукариотических организмов, функционирующих как единое целое, с многообразными и неоднозначными связями. С 80-х годов XX века внимание исследователей привлекло явление, давно известное в микробиологии как «фиксированная» форма существования бактерий, в том числе и патогенных, как на неживых субстратах, так и в различных ассоциациях: с водорослями, ризосферой растений, простейшими, ракообразными и другими организмами [2, 6, 11, 13,

24]. В англоязычной литературе этот феномен стал описываться как «биопленки».

Сканирующая лазерная микроскопия позволила наблюдать за развитием биопленочных сообществ, прикрепленных к субстратам естественного и искусственного происхождения [14, 15].

Изучение экологических аспектов формирования биопленок дает возможность выявить роль абиотических (состав сред, температура, pH) и биотических (простейшие) факторов в реализации данной стратегии существования микроорганизмов в природе, что особенно важно для возбудителей сапронозных инфекций, способных обитать в почвах и водоемах [3-5, 8]. В первом ряду оказались весьма значимые для инфекционной патологии микроорганизмы - легионеллы, псевдомонады и холерные вибрионы, однако и другие бактерии - кампилобактеры, клебсиеллы, сальмонеллы, листерии - также привлекли внимание исследователей способностью формировать биопленки [12, 18, 20, 22, 23, 25-27].

Burkholderia ceracia и близкородственные им *Pseudomonas aeruginosae* являются патогенными для человека, вызывая многочисленные случаи инфекций у иммунокомпрометированных больных, а также у пациентов, при лечении которых использовали имплантаты: искусственные клапаны сердца, линзы и другие эндопротезы. Установлено, что бактерии способны колонизировать

поверхности этих материалов, образуя биопленки [15-17]. В природных экосистемах участие *V.serasia* в формировании биопленок неизвестно.

Доказано, что *V.serasia* имеют тесные биоценотические связи с почвенными и водными простейшими (амебами, инфузориями) – основными природными хозяевами многих потенциально патогенных бактерий [7-10, 19, 21]. Не исключено, что свободноживущие простейшие в биопленочных сообществах могут занимать особый функциональный статус, однако эта их экологическая ниша пока остается неизвестной.

Цель данной работы - изучение способности инфузорий *Tetrahymena rugiformis* в ассоциации с *Burkholderia serasia* различных штаммов формировать биопленки в искусственной среде и модельной, приближенной к естественной.

Материалы и методы

В экспериментах использована группа изогенных штаммов *V.serasia*, различающихся по способности формировать биопленки:

- исходный штамм *V.serasia* 370, геномовар IIIa типа с умеренной способностью формировать биопленки, а также его мутанты, полученные методом инсерционного мутагенеза [26]:

- Vf++ – с повышенной способностью формирования биопленки;
- Vf- – дефектный по способности формировать биопленки.

Бактериальные культуры выращивали в агаризованной среде Luria-Bertani (LB) при 28⁰С; мутанты - с добавлением канамицина 100 мкг/мл и ампициллина 100 мкг/мл.

Биохимическую активность штаммов *V. сerasia* проводили на тест-системах API 20 NE (BIO - Merieux, France) и в ПЦР, которую ставили с парой праймеров Eub 16-1 (5' - AGGGTTGGATTCTGGCTCAG - 3') и CeMu Vi 16-2 (5' - CCGACTGTATTAGAGCCA - 3') для выявления последовательности 16S и 23S рибосомальной РНК длиной 463 п.н.

Аксеническую культуру инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (штамм GL из коллекции НИИЭМ им. Гамалеи) культивировали, как описано ранее [7].

Совместное культивирование буркхолдерий и простейших (микробная нагрузка 100 м.к. на 1 особь) проводили при 28⁰С в различных средах:

- в LB-бульоне;
- в смешанной среде - LB+почвенная вытяжка (в соотношении 1:1);

- в водной почвенной вытяжке (иловато-болотная почва Приокского заповедника).

Для контроля служили те же среды, содержащие *V.серасiа* соответствующих штаммов (без инфузорий), а также аксеническая культура простейших.

Биопленки получали в плоскодонных пластиковых планшетах для иммуноферментного анализа емкостью 3 мл. Для этого ночные культуры исследуемых штаммов разводили в соответствующей для каждого эксперимента свежей среде до концентрации 10^7 м.к./мл. Полученные суспензии стерильно вносили по 1,2 мл в лунки планшета (6 лунок для каждого штамма), затем в эти же лунки добавляли культуру *T.ругiformis* (10^5 ос/мл) в том же объеме. В контрольные лунки вносили отдельно культуры бактерий и инфузорий. Планшету помещали в термостат при 28°C , и образцы исследовали в динамике - от 24 до 72 часов.

Оптическую плотность планктонной субпопуляции бактерий определяли на фотометре iEMS Reader MF «Labsystems» (Швеция) при длине волны 540 нм. В определенном интервале времени содержимое всех лунок осторожно отсасывали и заполняли 2,4 мл дистиллированной воды с 250 мкл 1% спиртового раствора кристалл-виолета. Лунки, заполненные красителем, инкубировали

при комнатной температуре в течение 45 мин., затем краситель отсасывали, и лунки троекратно промывали дистиллированной водой. В отмытые от несвязавшейся краски лунки вносили по 3 мл этилового спирта и оставляли на 45 мин. при комнатной температуре. Полученный раствор в 4-кратной повторности переносили в лунки иммунологической планшеты меньшей емкости – 300 мкл. Количество сформировавшейся биопленки оценивали по интенсивности окрашивания спирта, что отражалось показателями фотометрии. Фоновые показатели регистрировали в лунках, содержащих «чистые» питательные среды и культуру простейших. Опыты повторяли трижды.

Количество планктонных бактерий регистрировали фотометрически и бактериологически, а инфузорий – микроскопией в камере Горяева (микроскоп Amplival, увеличение x20).

Статистическую обработку осуществляли по программе Excel 2000 (Microsoft Inc., 1999), Statistica for Windows v 5.0 (Statsoft Inc., 1995).

Результаты

Клетки *V.серасiа* исходного штамма и производных мутантов по культуральным, морфологическим, биохимическим,

цитопатогенным свойствам и способности к пигментообразованию не различались.

Использование трех сред культивирования – искусственной, оптимальной для формирования биопленки (LB-бульон), смешанной (LB+почвенная вытяжка) и приближенной к естественной (почвенная вытяжка) диктовалось необходимостью оптимизировать популяции буркхолдерий и тетрахимен к условиям одновременного существования и вместе с тем не только визуально оценивать формирование биопленок, но и проводить количественный учет их биомассы.

Все пробы инкубировали при 28⁰С – температуре, являющейся верхним пределом оптимума для инфузорий и наиболее благоприятной для размножения буркхолдерий.

Качественная оценка сформировавшихся биопленок. Были получены биопленки в разных культуральных средах, через сутки весьма слабые в отсутствие простейших и более заметные в ассоциации. При визуальной оценке через двое суток в большинстве лунок отмечали наличие сформировавшихся (зрелых) биопленок, причем простейшие явно стимулировали этот процесс. В LB-бульоне накопление биомассы было наибольшим, в смеси бульона с почвенной вытяжкой – умеренным и в почвенной вытяжке наименее выраженным. При этом буркхолдерии всех исследуемых штаммов, в

том числе и мутанта, дефектного по способности формировать биопленки в сообществе с простейшими, вели себя сходным образом и образовывали более интенсивную биопленку (табл.).

Известно, что популяции бактерий и простейших, участвующих в процессе формирования биопленок, состоят из свободно плавающих (планктонных) особей и фиксированных в экзополисахаридном матриксе форм [22, 23].

В ходе экспериментов оценивали динамику численности планктонных субпопуляций бактерий и инфузорий. При культивировании в LB-бульоне и смеси LB+почвенная вытяжка буркхолдерии всех испытанных штаммов в первые часы взаимодействия с инфузориями активно фагоцитировались последними, что подтверждалось микроскопически, однако темпы размножения в богатых питательных средах были достаточно высоки, чтобы компенсировать хищническое поглощение бактерий инфузориями. Бактериологические исследования выявили концентрации, близкие к исходным (10^7 КОЕ/мл). Через сутки наблюдали неуклонное увеличение численности бактерий до конца опыта (рис. 1А).

В контрольных образцах (без простейших) планктонные субпопуляции буркхолдерий всех испытанных штаммов размножались с одинаковой скоростью, достигая максимальной

концентрации 10^8 - 10^9 КОЕ/мл, что соответствует оптической плотности 0,7-1,0 (рис. 1Б).

Планктонные субпопуляции инфузорий в ассоциации с бактериями исходного штамма и мутанта Vf⁺⁺ снижали свою численность в течение 72 часов до 10^3 ос/мл, причем по мере созревания биопленок многие особи имели явные признаки деструкции, вплоть до разрыва клеток. Напротив, при взаимодействии с мутантом Vf⁻ (дефектным по способности формировать биопленки) тетрахимены бурно размножались, достигая максимальной концентрации 2×10^5 ос/мл.

Иным образом вели себя планктонные субпопуляции бактерий и простейших при культивировании в почвенной вытяжке. В ассоциациях буркхолдерии всех штаммов утилизировались инфузориями с невысокой интенсивностью, а темпы размножения позволяли бактериям сохранить численность на невысоком уровне.

Инфузории в почвенной вытяжке не испытывали цитопатогенного воздействия со стороны буркхолдерий: в планктонных субпопуляциях они находились в вегетативной форме, подвижны, без морфологических изменений, причем размножались с такой же скоростью как и в аксенической культуре.

Фотометрия интенсивности формирования биопленок выявила следующее. В LB-бульоне мутант, обладающий наибольшей

способностью к образованию биопленок (Vf⁺⁺), демонстрировал максимальное накопление биомассы как в отсутствие простейших, так и, особенно, в ассоциации с ними (рис. 2). Клетки буркхолдерий исходного штамма в ассоциации с инфузориями также весьма интенсивно формировали биопленку. В то же время мутант Vf⁻, который без простейших не проявлял активности, в ассоциации с инфузориями формировал биопленку, хотя и весьма слабую (рис. 2). В менее богатой среде (LB+почвенная вытяжка), а также в почвенной вытяжке эта закономерность сохранялась, однако количество биопленок было значительно ниже. Мутант Vf⁻ в отсутствие инфузорий ни в одной испытанной среде не формировал биопленку (табл.).

Световая микроскопия препаратов из биопленок (нативных и окрашенных по Романовскому-Гимзе) выявила структуры экзополисахаридного матрикса, в которых находились неподвижные округлившиеся клетки инфузорий, не перешедшие, однако, в цистную форму.

Обсуждение

Наше внимание было сфокусировано на абиотических (состав культуральных сред, температура) и биотических факторах (простейшие) среды, контролирующих процесс формирования

био пленок в модельных водных экосистемах. Качественный анализ образцов позволил визуально оценить, при каких условиях происходит наибольшее накопление пленочной биомассы. В.серасiа 370 исходного штамма и его мутанты с разной способностью формировать био пленки, в оптимальных температурных условиях (при 28⁰С) и богатых средах (LB-бульоне и его смеси с почвенной вытяжкой) через 2 суток на поверхности и стенках лунок образовывали тонкие пленки. В почвенной вытяжке они были едва заметны. Мутант, дефектный по формированию био пленок, ни в одной среде не проявлял этого признака.

Картина кардинально менялась, когда к бактериальным популяциям подсеяли инфузорий. Уже через двое суток во всех лунках, как с искусственной средой, так и с почвенной вытяжкой, наблюдали интенсивное накопление био пленок. Даже мутант, сам по себе не формировавший био пленки, проявлял это свойство (табл.). Максимальная биомасса накапливалась через 3-4 суток инкубации. Характерно, что такие сроки накопления био пленок отмечены для легионелл, псевдомонад и вибрионов [13, 14, 22, 23].

При количественной оценке наибольшее накопление био пленки выявлено при взаимодействии мутанта Vf++ с инфузориями в LB-бульоне; буркхолдерии остальных штаммов в сообществе с простейшими также обладали выраженной

способностью к формированию биопленки (рис. 2). В почвенной вытяжке все они также проявляли это свойство, хотя биопленок было значительно меньше.

Интересно отметить двоякую роль простейших при взаимодействии с буркхолдериями в процессе формирования биопленок. С одной стороны, они выполняют функцию хищников, утилизирующих часть планктонной субпопуляции бактерий, что соответствует результатам, полученным для синегнойной палочки и холерных вибрионов в сообществе с морскими жгутиконосцами (Flagellatae) - другими хищными простейшими [22, 23]. С другой стороны, в ходе этого процесса селектируются устойчивые к перевариванию бактериальные клетки, размножение которых переводит межпопуляционные взаимодействия в русло «паразито-хозяйинных», как это детально расшифровано у ряда патогенных бактерий, включая и *V.серасiа* [7]. Сформировавшиеся биопленки способствуют распространению и устойчивому существованию возбудителей в природных экосистемах [23].

Сами инфузории (по-видимому, их планктонная субпопуляция) стимулировали процесс формирования биопленок во всех вариантах опытов, причем продукция биомассы нарастала линейно в течение 3-4 суток. Проверка возможности утилизации

простейшими самих биопленок (данные не приводятся) показала, что этого не происходит.

Надо полагать, что сложные микроскопические методы, в частности с использованием сканирующего лазерного конфокального микроскопа, позволят вскрыть более тонкие структуры экзополисахаридного матрикса, сформированные протозойно-бактериальным сообществом.

Учитывая полученные результаты, можно предположить, что простейшие заметно способствуют существованию бактериальной популяции в составе биопленок. Своеобразие данной экологической ниши патогенных бактерий позволяет считать формирование биопленок с участием простейших, а возможно, и других сочленов биоценоза, одним из механизмов устойчивого существования возбудителей сапронозов в почвах и водоемах.

Исследование поддержано РФФИ, проекты № 06-04-49-287-а,

05-04-49-379.

Таблица. Способность разных штаммов *Burkholderia ceracia* к формированию биопленок в ассоциации с простейшими и в их отсутствие

Варианты опытов, штаммы	Эффект (в LB)	Эффект (в LB/ПВ)	Эффект (в ПВ)
1. <i>T.pyriformis</i> + <i>B.ceracia</i> 370 (исходный)	++++	+++	++/+
2. <i>B.ceracia</i> 370 (исходный)	++	++/++++	+
3. <i>T.pyriformis</i> с мутантом Vf++	+++++	++++	++/+
4. Vf++	++++	+++ /++++	+
5. <i>T.pyriformis</i> с мутантом Vf-	++	++/+	+
6. Vf-	-	-	-

Примечание: LB – бульон; LB/ПВ – почвенная вытяжка;

ПВ – почвенная вытяжка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. // Генетика. 2004. № 40 (11). С. 1.
2. Куликовский А.В., Павлова И.Б., Айвазян М.А., Дроздова Т.Д. // Вестник с.-х. науки. 1990. № 12. С. 101.
3. Литвин В.Ю. // Экология возбудителей сапронозов. Москва. 1988. С. 142.
4. Литвин В.Ю. // Потенциально патогенные бактерии в природе. Москва. 1991. С. 93.
5. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И., Романова Ю.М., Боев Б.В. // Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М.: Фармарус принт, 1998. 256 с.
6. Мидоуз П. // IX Междун. конгресс по микробиологии. Москва. 1966. С. 361.
7. Пушкарева В.И., Константинова Н.Д., Литвин В.Ю. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992. № 2. С. 4.
8. Пушкарева В.И. Патогенные бактерии в почвенных и водных сообществах // Дисс. докт. биол. наук. Москва. 1994.
9. Пушкарева В.И., Величко В.В., Каминская А.А., Литвин В.Ю. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005. № 3. С. 39.

10. Пушкарева В.И. // Успехи соврем. биологии. 2006. Т. . №4. С.
11. Сукачев В.Н. Основы теории биогеоценологии. М. АН СССР. 1947. 283 с.
12. Boyd A., Chakrabarty A.M. // J. Ind. Microbiol. 1995. V. 15. P. 162.
13. Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.-J. // Ann. Rev. Microbiol. 1987. V. 41. P. 435.
14. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. et. al. // Microbiol. biofilms. Ibid. 1995. V. 49. P. 711.
15. Donlan R.M., Costerton J.W. // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. P. 167.
16. Gauthier Y., Isoard P. et. al. // Ind. alim et agr. 1989. V. 106. N 1-2. P. 31.
17. Girardeau J.P. // "6 eme Reun. Microbial. INRA. Murat-le-Quaire. Versailles. 1982. P. 9.
18. Keevil C.W. // Water Sci. Technol. 2003. V. 47 (5). P. 105.
19. Landers P., Kerr K.G., Rowbotham T.J. et. al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000. V. 19. P. 121.
20. Mampel J., Spirig T., Weber S.S. et. al. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72 (4). P. 2885.

21. Marolda C.L., Hauröder B., John M.A. et al. // *Microbiology*. 1999. V. 145. P. 1509.
22. Matz C., Bergfeld T., Rice S.A. et al. // *Environment. Microbiol.* 2004. V. 6 (3). P. 218.
23. Matz C., McDougald D., Moreno A.M. et al. // *PNAS*. 2005. V. 102. № 46. P. 16819.
24. Pedersen K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1982. V. 44. P. 1196.
25. Stepanovic S., Cirkovic I., Ranin L. et al. // *Lett Appl Microbiol.* 2004. V. 38. P. 428.
26. Watnick P., Kolter R. // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 34(3). P. 586.
27. Weitere M., Bergfeld T., Rice S.A. et al. // *Environ. Microbiol.* 2005. V. 7 (10). P. 1593.

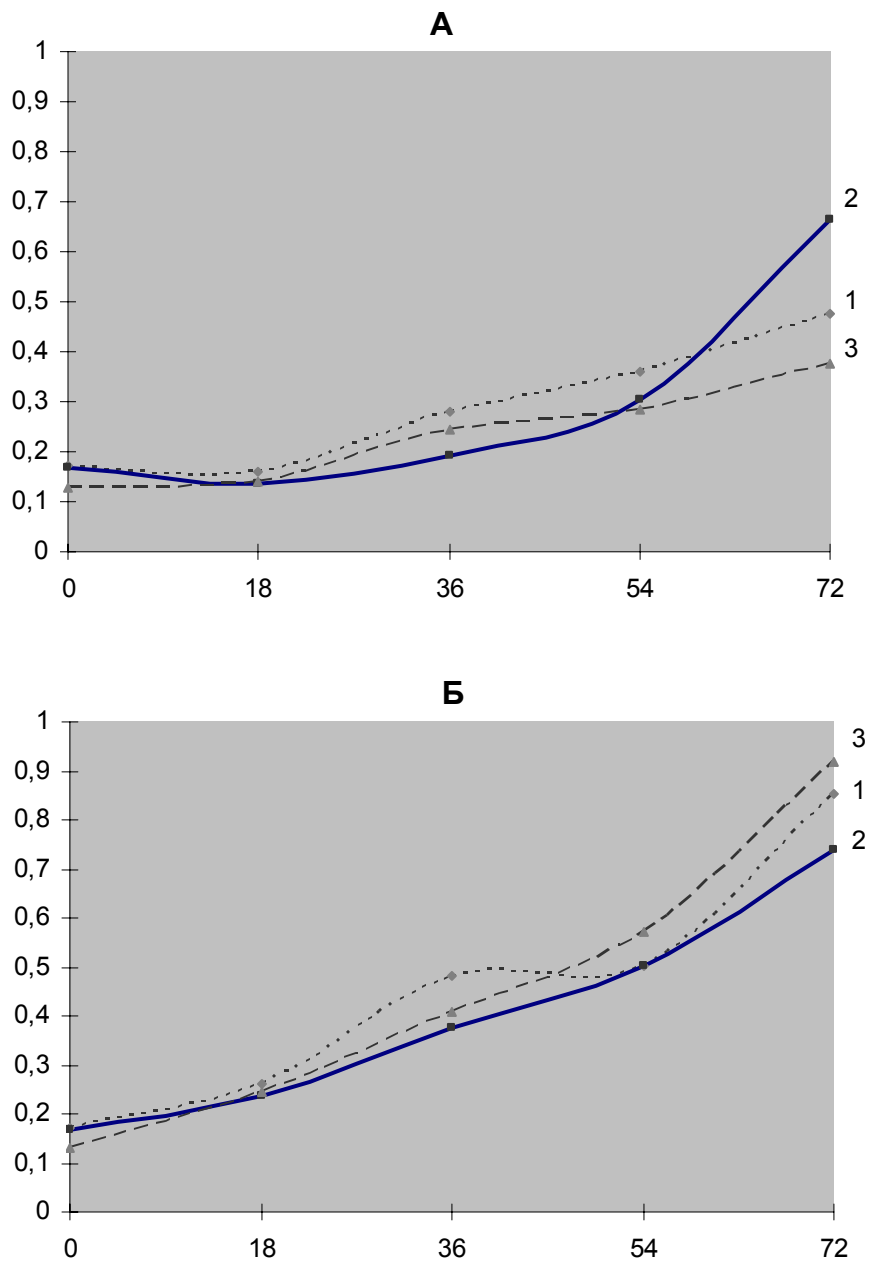


Рис. 1.

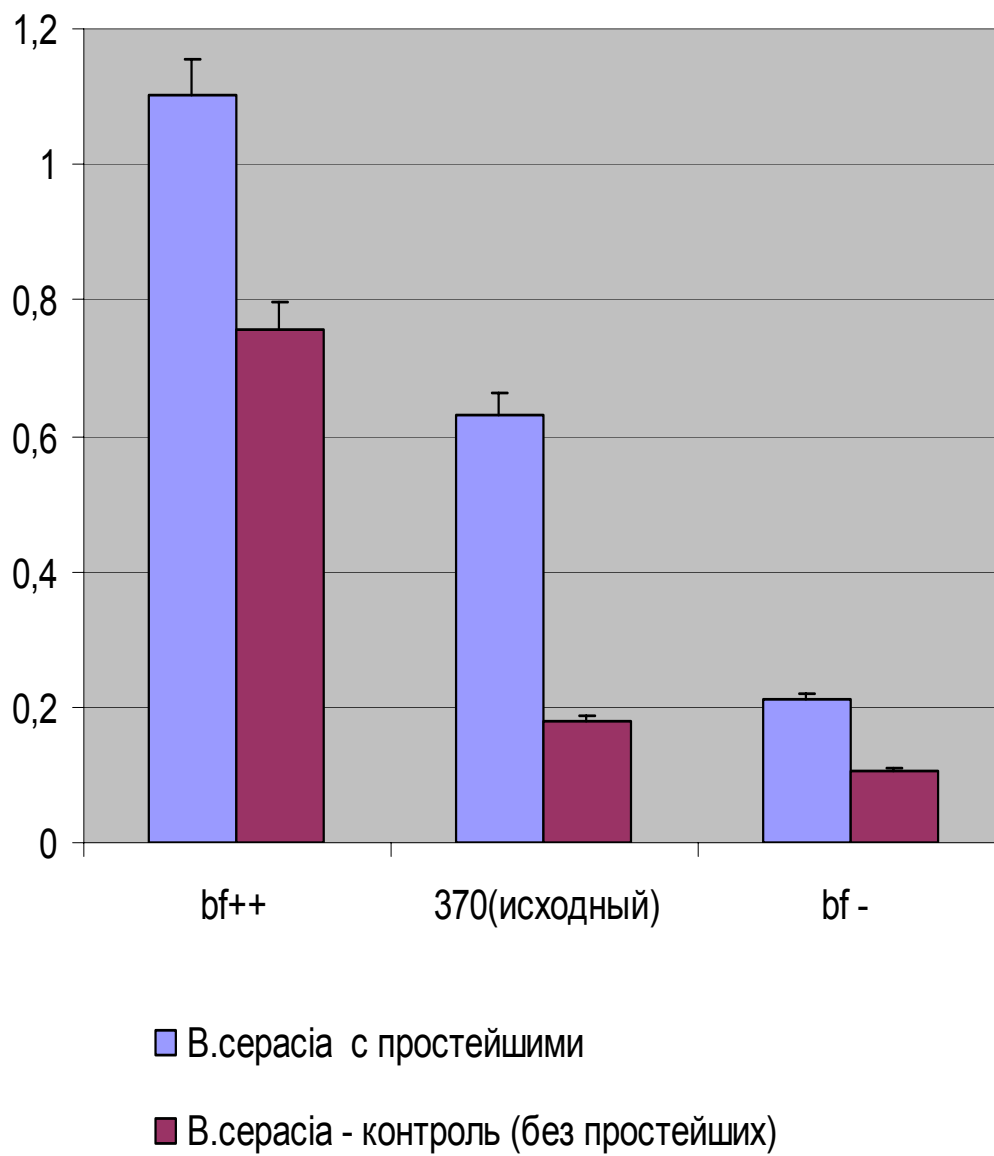


Рис. 2.

Подписи к рисункам статьи Каминской А.А. с соавт. «Роль ассоциации простейших *Tetrahymena pyriformis* и бактерий *Burkholderia ceracia* в формировании биопленок».

Рис. 1. Динамика численности планктонных субпопуляций буркхолдерий в LB-бульоне при 28⁰С:

А - в ассоциации с простейшими;

Б - без простейших:

1. 370 исходный; 2. bf ++; 3. bf -

по оси ординат - оптическая плотность (ед.);

по оси абсцисс - время инкубации (час).

Рис. 2. Количественные оценки биопленок, образованных клетками различных штаммов *B. ceracia* в ассоциации с простейшими при инкубации в LB-бульоне при 28⁰С.

по оси ординат - оптическая плотность (ед.).

Резюме статьи Каминской А.А. с соавт. «Роль ассоциации простейших *Tetrahymena pyriformis* и бактерий *Burkholderia* серасіа в формировании биопленок»

Изучали способность инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в ассоциации с *Burkholderia* серасіа различных штаммов формировать биопленки в искусственной среде и модельной, приближенной к естественной. Качественная (визуальная) оценка сформировавшихся биопленок показала, что исходный штамм *B.серасіа* и мутант *bf++* во всех средах (LB-бульон, LB/ПВ и почвенная вытяжка) при начальной концентрации 10^{6-7} кл/мл при температуре 28⁰С образовывали биопленки, тогда как мутант *bf-*, дефектный по способности формировать биопленки, ни в одной среде не проявлял этого признака. Простейшие стимулировали этот процесс во всех вариантах опытов, не исключая и ассоциацию с мутантом *bf-*. Количественный учет биопленок проводили методом регистрации связанного красителя кристалл-виолета в фотометре iEMS Reader MF. Максимальное накопление биопленок наблюдали в LB-бульоне, среднее – в смеси LB - почвенная вытяжка и слабое – в почвенной вытяжке. Инфузории снижали свою численность в ассоциациях с исходным штаммом и мутантом *bf++* с 10^5 до 10^3 ос/мл. Напротив, при взаимодействии с мутантом *bf-* простейшие достигали максимальной концентрации 2×10^5 ос/мл. Сформировавшиеся биопленки могут служить дополнительным резервуаром *B.серасіа* в природных экосистемах.