

Ю.В.Сизова, И.Я.Черепяхина, В.В.Балахнова, О.С.Бурлакова, Е.В.Сизова, О.И.Помухина,  
О.П.Фецайлова

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СВОЙСТВ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ К ВЫЖИВАНИЮ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, В БИОПЛЕНОЧНЫХ СООБЩЕСТВАХ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону

Представлены результаты изучения вариабельности ряда свойств, характеризующие персистентный потенциал холерных вибрионов в биопленочном сообществе при длительном культивировании в речной воде. Показано, что эпидемически значимые холерные вибрионы в холодной воде образуют тонкие биопленки и в большинстве своем погибают. Атоксигенные штаммы, выделенные из воды, могут длительно выживать в окружающей среде как в теплое, так и холодное время года за счет образования биопленки и реализации персистентной активности. Выраженность изученных свойств, кроме антилизозимной активности (АЛА), прямо коррелировала с интенсивностью биопленкообразования, а при исследовании имела место обратная зависимость.

*Ключевые слова:* биопленка, холерный вибрион, персистенция, адаптация, антилизозимная активность, каталазная активность, билирезистентность.

Yu.V.Sizova, I.Ya.Cherepakhina, V.V.Balakhnova, O.S.Burlakova, E.V.Sizova, O.I.Pomukhina, O.P.Fetsaylova

## Variability of Properties Characterizing Persistent Potential of Cholera Vibrio in Biofilm Communities

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don

Represented are the results of studies on variability of properties characterizing persistent potential of *V. cholerae* in biofilm communities under the long-term cultivation in river water. Demonstrated is the fact that in the cold water epidemically significant cholera vibrios form thin biofilms and do not survive for the most part. But atoxigenic strains, isolated from the water, can survive in the environment both in the cold and warm time of the year due to formation of thick biofilm and realization of the persistent activity. Expressiveness of the properties studied, except antilysozyme activity (ALA), directly correlate with biofilm formation intensity. In case of ALA one observes inverse correlation.

*Key words:* biofilm, cholera vibrio, persistency, adaptation, antilysozyme activity, catalase activity, biliresistance.

Одним из наиболее обсуждаемых в последние годы является вопрос о роли среды обитания в обеспечении условий для выживания и длительной персистенции жизнеспособных популяций микроорганизмов, а также роли генотипического и фенотипического потенциала бактерий в этом процессе.

Установлено, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных экосистемах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок, которые функционируют как скоординированный консорциум. Такое «социальное поведение» микроорганизмов обеспечивает им защиту и позволяет выжить в неблагоприятных условиях (при недостатке питательных веществ, воздействии бактериофагов и простейших). Биопленки способствуют длительной персистенции микробов в окружающей среде и хронизации инфекционного процесса в макроорганизме путем повышения устойчивости к воздействию антибиотиков, антител, фагоцитов и других потенциально опасных факторов. Основным фактором устойчивости биопленок является экзополисахаридный матрикс, вырабатываемый клетками бактерий сразу после прикрепления к субстрату. Он сложен по составу и меняется в результате адаптации бактерий к условиям окружающей среды, его основу составляют экзополисахариды, липополисахариды, гликопротеины и протеогликаны [10]. Механизм и

особенности формирования биопленок в окружающей среде и макроорганизме у холерных вибрионов достаточно хорошо изучены [1, 8, 9]. Очевидно, что биопленки играют чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Однако работ, посвященных изучению свойств холерных вибрионов при персистенции их в биопленочном сообществе, практически нет.

Целью работы было изучение диапазона вариабельности ряда свойств холерных вибрионов, играющих роль в их персистенции, в зависимости от интенсивности образования биопленок при длительном культивировании возбудителя холеры в речной воде при разных температурах.

### Материалы и методы

В работе использовано пять штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп, имеющих различный набор детерминант патогенности, выделенных от больных и из речной воды. Для решения поставленных задач холерные вибрионы инкубировали в стерильной речной воде в течение девяти месяцев при температуре 4 и 22 °С. Опыты были повторены дважды (2009–2010 и 2010–2011 гг.), в таблице приведены средние результаты.

Биопленки изучали по методике P.L.Watnick *et al.* [13]. Антилизозимную активность определяли ча-

Характеристика свойств холерных вибрионов и интенсивности образования биопленок до и после инкубации в речной воде при различных температурах

Серо- группа	Штамм	Место, год, источник выделения	Наличие генов		Культура	АЛА, мкг/ мл	БР, %	КА, ЕД	ОП биопленки	Удельный вес выживших клеток, %
			ctx	tcp						
O1	P-15499	Вилково, 1991 г., больной	+	+	Исходная	7	136,3	6,9		
					Биопленка, 22 °С	2	176,6	3,2	0,278	3
					Биопленка, 4 °С	4	165,5	1,8	0,087	0,14
	18418	Казань, 2001 г., больной	+	+	Исходная	7	125,1	4		
					Биопленка, 22 °С	2	175,3	3,9	0,302	3,6
					Биопленка, 4 °С	6	137,2	1,5	0,12	0,16
P-18775	Ростовская обл., Каменский р-н, 2005 г., больной	-	+	Исходная	9	91,6	3,2			
				Биопленка, 22 °С	2	134,7	3,1	0,227	0,29	
				Биопленка, 4 °С	6	117,8	1,5	0,099	0,11	
P-18774	Ростов-на-Дону, 1999 г., речная вода	-	-	Исходная	10	73,9	12,9			
				Биопленка, 22 °С	8	81,91	7,7	0,029	4,25	
				Биопленка, 4 °С	3	105,9	11,1	0,199	5,25	
O139	P-16065	Ростовская обл., 1993 г., больной	+	+	Исходная	2	114,9	10		
					Биопленка, 22 °С	2	138,7	2,9	0,658	2,5
					Биопленка, 4 °С	6	129,6	1,5	0,423	0,33

шечным методом [5]. Оценку уровня каталазной активности (КА) проводили кинетическим методом [4]. Уровень билирезистентности (БР) бактерий определяли методом прямой спектрофотометрии при длине волны 540 нм. Результаты оценивали по отношению оптической плотности (ОП) в опытной пробе к ОП в контроле, выраженному в процентах. Все результаты статистически обработаны.

### Результаты и обсуждение

Изучение способности к биопленкообразованию у холерных вибрионов O1 серогруппы показало, что оптическая плотность биопленок у культур, выделенных от людей, колебалась незначительно (таблица). Показатели ОП у тех же изолятов при сохранении в холодной воде (4 °С) были ниже, чем в воде комнатной температуры в 2,5–3 раза. При этом было установлено, что выжившие клетки в биопленках при этой температуре составляли всего десятые доли процента. Таким образом, показано, что эпидемически значимые холерные вибрионы в холодной воде не образуют мощные защитные биопленки и в большинстве своем погибают.

Напротив, у атоксигенного штамма, выделенного из речной воды, показатели биопленкообразования при 4 °С были почти в семь раз выше, чем при инкубации при 22 °С, то же касается и выживаемости – она была несколько выше в холодной воде. Повторяемость результатов в двух опытах свидетельствует о том, что популяции таких штаммов могут длительно персистировать в окружающей среде как в теплое, так и холодное время года за счет большей приспособляемости к выживанию в водных экосистемах.

У штамма O139 серогруппы показатели оптической плотности были гораздо выше, чем у холерных вибрионов O1 серогруппы (при 22 °С – 0,658, при 4 °С – 0,423). Возможно, способность к образованию

биопленки более выражена у капсульных форм холерных вибрионов. Но даже это не обеспечивало выживания в холодной воде вибрионов O139 серогруппы, выделенных от больных людей, т.е. наблюдалась та же картина, что и при исследовании штаммов O1 серогруппы – выжившие вибрионы составляли всего 0,33 % от количества, взятого в опыт.

Все вышесказанное свидетельствует о наличии механизма регуляции процесса образования биопленок у холерных вибрионов. С.П.Заднова [7] предполагает, что у возбудителя холеры существует неизвестная регуляторная система, которая в ответ на определенные сигналы из окружающей среды изменяет экспрессию ряда генов, в том числе кодирующих синтез экзополисахарида.

Параллельно с исследованием динамики биопленкообразования проводили изучение свойств холерных вибрионов, способствующих персистенции: антилизоцимной, каталазной активностей и билирезистентности.

После длительной инкубации холерных вибрионов O1 серогруппы в речной воде при разных температурах наблюдалось снижение значения антилизоцимной активности у биопленочных культур по сравнению с исходными штаммами, но в разной степени. Обращает на себя внимание наличие обратной корреляции в значениях АЛА и оптической плотности биопленок: у штаммов, изолированных от больных, в биопленке при температуре инкубации 22 °С при более высоких значениях ОП уровни АЛА были ниже, чем при 4 °С, а у водного штамма, наиболее приспособленного к жизнедеятельности при низких температурах – наоборот. Вероятно, в наиболее неблагоприятных условиях, в отсутствие выраженной защитной биопленки, холерные вибрионы компенсаторно сохраняют достаточно высокий уровень АЛА, чтобы выжить.

Та же картина наблюдалась у холерных вибрионов O139 серогруппы: несмотря на то, что этот

штамм образовывал мощную биопленку при 22 °С (ОП 0,658), значение АЛА было низким (2 мкг/мл). И, напротив, при более низкой ОП (0,432) в выжившей при 4 °С популяции холерные вибрионы сохраняли достаточно высокий уровень антилизоцимной активности (6 мкг/мл), очевидно, пытаясь нивелировать стрессорное воздействие низкой температуры. Как известно, в неблагоприятных условиях бактерии включают комплекс стрессориндуцибельных систем ответа [2].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что так называемая антилизоцимная активность холерных вибрионов – признак вариабельный, а ее диапазон зависит от условий окружающей среды (в частности, пребывания в речной воде в биопленочном сообществе), а также степени стрессорных воздействий, инициирующих реализацию биологической функции адаптации *V. cholerae*. При этом мы, как и другие исследователи [10], учитываем, что результаты были получены в лабораторных условиях в отсутствие других микробных ассоциантов, а в природных водоемах они могут являться частью более крупного биоценоза, сформированного с участием лизоцимактивных партнеров, поэтому показатели АЛА в каждом конкретном случае будут зависеть и от них.

С учетом полученных результатов возникает вопрос о механизме регуляции факторов персистенции, в частности, антилизоцимной активности. Установлено, что белок, отвечающий за так называемую антилизоцимную активность молекулярной массой от 14 до 21 кД [6], секретируется бактериями во внешнюю среду. Какими функциями, помимо нейтрализации лизоцима, обладает данный белок – неизвестно. Еще в 1994 г. В.М.Бондаренко и соавт. [3], а позднее О.В.Бухарин и соавт. [6] пришли к выводу, что АЛА и устойчивость к антибиотикам у различных микроорганизмов кодируется R-плазмидой. В наших опытах лишь единичные штаммы с высокой АЛА имели множественную лекарственную устойчивость, что ставит под сомнение плазмидную природу этого фактора у холерных вибрионов.

В свете последних данных о функциональной роли белка ToxR в регуляции экспрессии белков наружной мембраны (БНМ) возбудителя холеры [7, 12] можно предположить, что он, воспринимая сигналы из окружающей среды, управляет также экспрессией ряда белков, участвующих в реализации персистентного потенциала, в том числе антилизоцимной активности. По мнению С.П.Задновой [7], белки внешней мембраны, синтез которых регулируется белком ToxR, выполняют ряд важных функций, способствуя сохранению жизнедеятельности холерных вибрионов в кишечнике хозяина и во внешней среде. Так, установлено влияние ToxR на экспрессию белка наружной мембраны OmpU, обладающего защитной функцией против повреждающего воздей-

ствия желчи на клетки холерных вибрионов. Как известно, билирезистентность является одним из ведущих факторов, обуславливающих их персистенцию в организме человека. В воде открытых водоемов и сточной воде холерные вибрионы подвержены воздействию различных моющих средств, содержащих поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые, как известно, обладают, как и желчные кислоты, детергентными свойствами.

В наших опытах отмечена прямая зависимость между степенью образования биопленки и резистентностью к желчи. Билирезистентность повышалась у всех биопленочных культур, но ее уровень коррелировал с показаниями ОП. Большинство штаммов обладало более высокой билирезистентностью при 22 °С, и при этой температуре отмечены более высокие показатели ОП биопленок. У штамма, выделенного из воды, более высокий уровень билирезистентности, как и высокая ОП, наблюдался при 4 °С. Все это также свидетельствует о наличии регуляторного механизма, способствующего персистенции выжившей в условиях стресса части популяции.

Такой же характер адаптации имел место при изучении каталазной активности холерных вибрионов, выделенных из биопленок после девяти месяцев инкубации в речной воде. По мере снижения температуры и, соответственно, ОП биопленок, понижался уровень каталазной активности. Интересен результат, полученный при изучении штамма, выделенного из речной воды, у которого более высокий уровень биопленкообразования наблюдался при 4 °С, и уровень КА был выше, чем при 22 °С. В наших опытах у данного штамма наблюдались наибольшие показатели КА, что может быть связано с тем, что в водной среде защита от перекиси водорода зависит только от самого микроба, в то время как у штаммов, выделенных от больных и носителей, к этим процессам подключаются ферментативные системы макроорганизма.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что при выживании в биопленочном сообществе у холерных вибрионов модифицируются свойства, обуславливающие персистентный потенциал. При этом вариабельность изученных свойств, кроме антилизоцимной активности, прямо коррелировала с интенсивностью биопленкообразования, а при исследовании АЛА имела место обратная зависимость.

Суммируя все вышеизложенное можно сделать вывод, что холерные вибрионы обладают большим запасом пластичности, обеспечивающей им выживание в меняющихся условиях окружающей среды. Не вызывает сомнения, что процессы адаптации этого патогена, фенотипической вариабельности свойств, обуславливающих персистентный потенциал, и образование биопленки координировано регулируются генетической системой в ответ на стрессовые сигналы из окружающей среды.

## 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; 20:77–80.
2. Баснакьян И.А., Бондаренко В.М., Мельникова В.А., Белявская В.А. Стрессор-индуцибельные белки и вирулентность. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 5:101–8.
3. Бондаренко В.М., Петровская В.Г., Яблочков А.Л. Антилизосимный фактор *Klebsiella pneumoniae*: природа, биологические функции и генетический контроль. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1994; 5(Приложение):22–7.
4. Брудастов Ю.А., Сборец Т.С., Дерябин Д.Г. Активность каталазы и супероксиддисмутазы *Staphylococcus aureus* при персистенции в макроорганизме. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 2:13–6.
5. Бухарин О.В., Дерябин Д.Г. Экологическая детерминированность маркеров персистенции стафилококков. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997; 4:60–3.
6. Бухарин О.В., Кириллов Д.А., Кириллов В.А. Скрининг плазмид у бактерий рода *Vacillus*, обладающих антилизосимной активностью. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 1:3–6.
7. Заднова С.П. Функциональная роль ToxR-регулируемых белков внешней мембраны *Vibrio cholerae*. Пробл. особо опасных инф. 2004; 1(87):9–13.
8. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Марамович А.С., Миронова Л.В., Санто С.Г. Способность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп к образованию биопленки в эксперименте. Холера и патогенные для человека вибрионы. 2009; 22:90–3.
9. Лобанов В.В. Проблемы колонизации кишечника холерными вибрионами. Эпидемиол. и инф. бол. 2009; 3:37–9.
10. Немцова Н.В., Игнатенко М.Е., Селиванова Е.А., Гоголева О.А., Яценко-Степанова Т.Н., Плотников А.О. Регуляция симбиотических взаимодействий в альго-бактериальных ассоциациях. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 4:62–6.
11. Gander S. Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 1996; 37:1047–50.
12. Peterson K.M. Expression of *Vibrio cholerae* virulence genes in response to environmental signals. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2002; 3:29–36.
13. Watnick P.L., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. Mol. Microbiol. 1999; 34:285–95.

## References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Alekseeva L.P., Chemisova O.S., Mazrukho B.L., Shestialtynova I.S., Mikhaleva V.V., Tatarenko O.A., Markina O.V. [Concerning ability of cholera vibrios El Tor to produce exopolysaccharide]. Kholera. Patogen. Dlya Chelov. Vibriony. 2007; 20:77–80.
2. Basnak'yan I.A., Bondarenko V.M., Mel'nikova V.A., Belyavskaya V.A. [Stress-induced proteins and virulence]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2001; 5:101–8.
3. Bondarenko V.M., Petrovskaya V.G., Yablochkov A.L. [Antilysozyme factor of *Klebsiella pneumoniae*: its nature, biological functions, and genetic control]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1994; 5(Suppl.):22–7.
4. Brudastov Yu.A., Sborets T.S., Deryabin D.G. [Catalase and superoxide dismutase activity of *Staphylococcus aureus* in case of persistence in microorganism]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2001; 2:13–6.
5. Bukharin O.V., Deryabin D.G. [Ecological determinacy of *Staphylococcus* persistence markers]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1997; 4:60–3.
6. Bukharin O.V., Kirillov D.A., Kirillov V.A. [Screening of plasmids in *Bacillus* species bacteria that show antilysozyme activity]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 1:3–6.
7. Zаднова S.P. [Functional role of ToxR-regulated outer-membrane proteins of *Vibrio cholerae*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; (87):9–13.
8. Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., Maramovich A.S., Mironova L.V., Sappo S.G. [Ability of Cholera vibrio O1 and O139 to form biofilm *in vitro*]. Kholera. Patogen. Dlya Chelov. Vibriony. 2009; 22:90–3.
9. Lobanov V.V. [Aspects of intestine colonization by *V. cholerae*]. Epidemiol. Infek. Bol. 2009; 3:37–9.
10. Nemtsova N.V., Ignatenko M.E., Selivanova E.A., Gogoleva O.A., Yatsenko-Stepanova T.N., Plotnikov A.O. [Regulation of symbiotic interactions in algobacterial associations]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 4:62–6.

## Authors:

Sizova Yu.V., Cherepakhina I.Ya., Balakhnova V.V., Burlakova O.S., Sizova E.V., Pomukhina O.I., Fetsaylova O.P. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aanet.ru

## Об авторах:

Сизова Ю.В., Черепакхина И.Я., Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Сизова Е.В., Помухина О.И., Фецайлова О.П. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru

Поступила 19.10.11.