

УДК 579.61:616-092

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАВАЮЩЕЙ БИОПЛЕНКИ *Bacillus cereus*

© 2020 г. З. С. Плиева¹, Т. А. Смирнова¹, Н. В. Шевлягина¹, В. Г. Жуховицкий^{1,*}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

*e-mail: zhukhovitsky@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.03.2020 г.

После доработки 04.03.2020 г.

Принята к публикации 04.03.2020 г.

С помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии представлены результаты изучения плавающей биопленки, образуемой эталонными и свежевыделенными из клинического материала штаммами *Bacillus cereus*. Выявлены и обсуждены различия в ультраструктуре плавающей биопленки отдельных штаммов *B. cereus*. Показано, что штаммы *B. cereus* не способны к эффективной споруляции в условиях плавающей биопленки. Полученные результаты свидетельствуют в пользу способности *B. cereus* к размножению и биопленкообразованию в жидких средах. Плавающая биопленка может рассматриваться как модель развития бацилл в жидких пищевых продуктах.

Ключевые слова: биофильмогенез, споруляция, трансмиссионная электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0042132420030072

ВВЕДЕНИЕ

Биопленка рассматривается как структурированное сообщество бактериальных клеток, заключенное в продуцируемый им самим полимерный матрикс и адгезированное к абиогенным либо биогенным поверхностям (Costerton, 1999). В естественных условиях существования биопленка представляет собой функциональный консорциум, обеспечивающий персистенцию бактериальной популяции (Costerton et al., 1999). Способностью к образованию биопленки (биофильмогенезу) обладают как грампозитивные, так и грамотрицательные бактерии, причем у патогенных штаммов бактерий эта способность связана с повышенной вирулентностью (Aragna, Yadav, 2008), и патогенные штаммы *B. cereus* не являются исключением (Kuroki et al., 2009). При этом процессы биофильмогенеза и спорообразования у бацилл тесно связаны — более того, биопленка способствует спорообразованию (Liaqat et al., 2013).

Способность *Bacillus subtilis* к образованию плавающей биопленки при культивировании на жидкой питательной среде без встряхивания была продемонстрирована ранее (Liaqat et al., 2013). Аналогичные результаты были получены нами на модели *Brevibacillus laterosporus* (Азизбекян и др., 2014).

Способность *B. cereus* к образованию биопленки изучена сравнительно слабо.

Целью настоящего исследования явилось изучение ультраструктуры плавающей биопленки, образуемой эталонными штаммами *B. cereus* и штаммами *B. cereus* клинического происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы: эталонный штамм *B. cereus* ATCC® 10702 (NCTC 8035/DSM 487/NRRL B-4266) из коллекции культур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и эталонный штамм *B. cereus* ATCC® 10876 (NCTC 7464/DSM 9378/NRRL B-569), любезно предоставленный проф. Р.Р. Азизбекяном, НИЦ “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика, а также клинические изоляты *B. cereus* 1208/17 и *B. cereus* 19/16, свежевыделенные из просветных фекалий при синдроме раздраженной кишки, любезно предоставленные к.б.н. М.А. Сухиной, ГНЦК им. А.Н. Рыжих МЗ РФ.

Экспериментальные культуры выращивались на изготавливаемой *ex tempore* неконвенциональной питательной композиции NBY (Nutrient Broth — 8 г/л, Vactoagar — 18 г/л, Yeast Extract — 3 г/л, все — производства Becton Dickinson, США) при 28°C в течение 72 ч. Плавающую биопленку получали в процессе культивирования в пробирках на бульоне LB (Becton Dickinson, США) при 28°C в течение 96 ч без встряхивания. Для приготовления ультратонких срезов биопленки материал

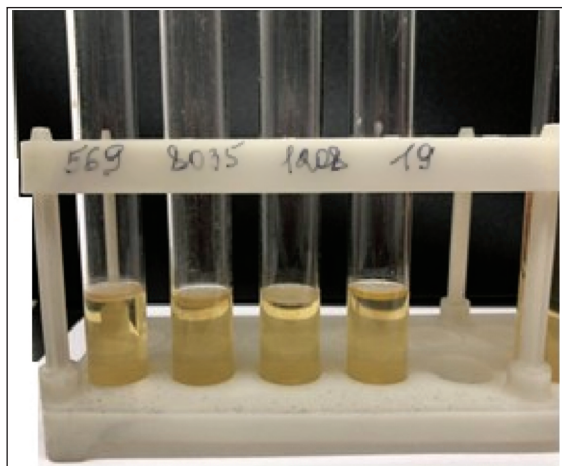


Рис. 1. Плавающая биоуплотненная пленка коллекционных штаммов и клинических изолятов *B. cereus*: ATCC® 10876, ATCC® 10702, 1208/17, 19/16 (слева направо).

фиксировали по Ито–Карновски (Ito, Karnovsky, 1968) фиксатором, состоящим из формальдегида (2%), глутарового альдегида (2.5%) и пикриновой

кислоты (0.02%). Далее материал подвергли постфиксации 1% OsO_4 на 0.2 М какодилатном буфере и 1% уранилацетата на 0.2 М малеатном буфере. Фиксированный материал обезвоживался последовательно 50, 70, 96, 100% этанолом. Затем материал пропитывался смесью смолы LR White (London Resin Company Ltd., Великобритания) с 100% этанолом, чистой смолой LR White и помещался в желатиновые капсулы со смолой, которые инкубировались 1 сутки при 56°C. Ультратонкие срезы для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) изготавливались с помощью ультратома LKB-8800 (LKB AB, Швеция) и контрастировались 1% уранилацетатом на 70% этаноле и цитратом свинца. Препараты просматривались на электронном микроскопе JEM-100B (JEOL Ltd., Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Препараты для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) изготавливались согласно методике, описанной ранее (Смирнова и др., 2013). Исследуемый материал не подвергался дегидратации: фиксировался 10% нейтральным формалином, высушивался под восходящим ла-

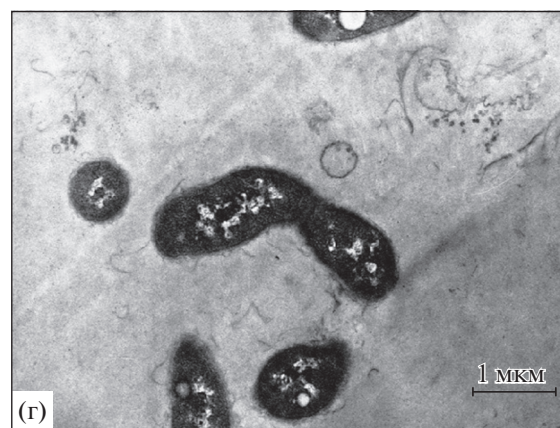
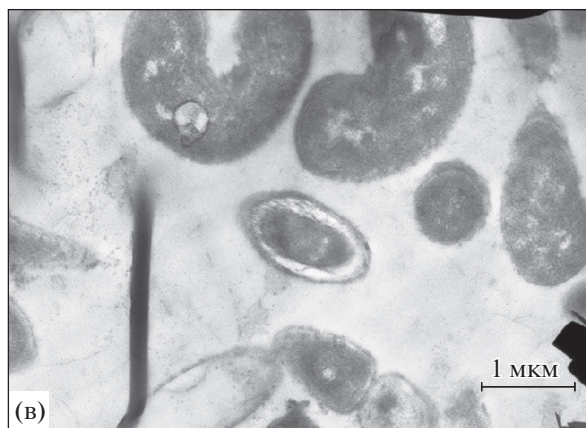
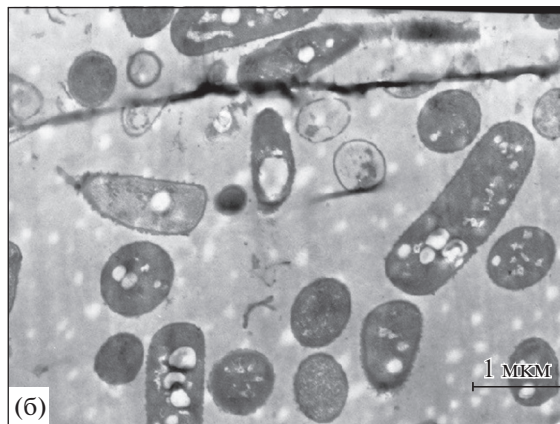
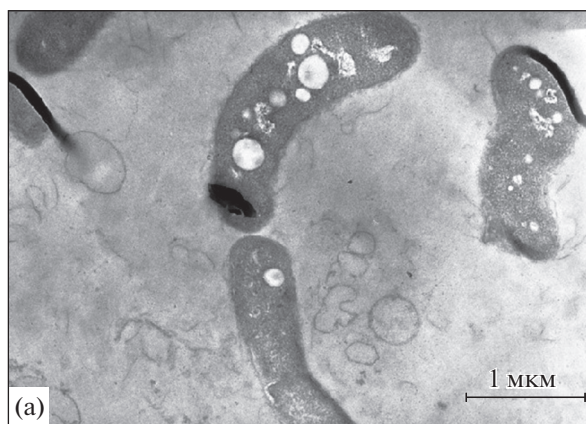


Рис. 2. ТЭМ, ультратонкие срезы штаммов *B. cereus*: (а) – эталонный штамм ATCC® 10876; (б) – клинический изолят 1208/17; (в), (г) – клинический изолят 19/16.

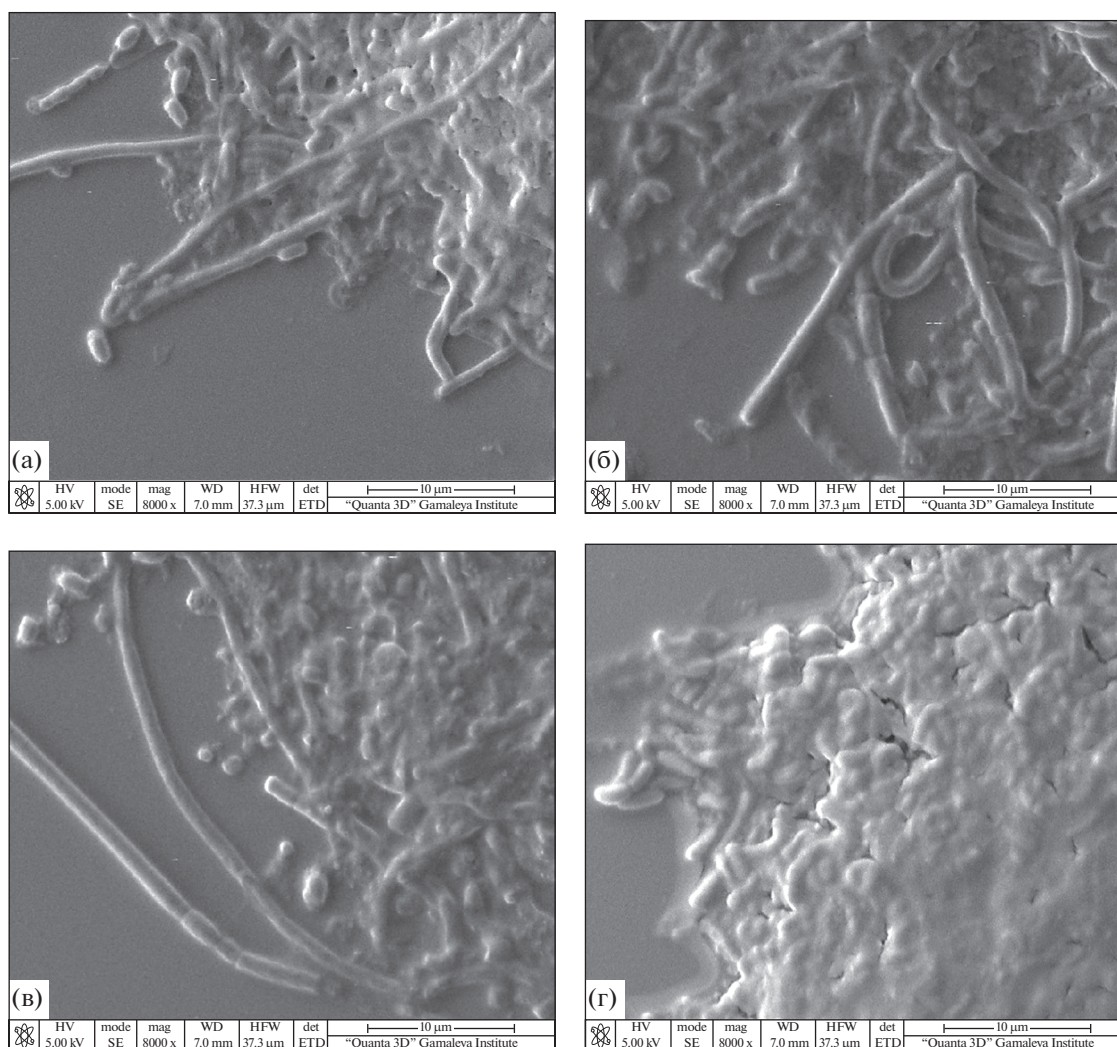


Рис. 3. СЭМ биопленок *B. cereus*: (а) – эталонный штамм ATCC® 10876; (б) – эталонный штамм ATCC® 10702; (в) – клинический изолят 1208/17; (г) – клинический изолят 19/16.

минарным потоком стерильного воздуха и помещался на кремниевую подложку, после чего подвергался напылению электропроводящим слоем золота (проба Au₉₉₉) толщиной 5 нм в напылительной установке SPI Module Sputter Coater (Sputter SPEI, США). Препараты исследовались с помощью двулучевого ионно-электронного сканирующего микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 48 ч роста в стационарных условиях у всех четырех изученных штаммов *B. cereus* была обнаружена плавающая биопленка (рис. 1), наиболее выраженная у клинического изолята *B. cereus* 19/16. Дальнейшее культивирование сопро-

вождалось оседанием биопленки: подобная стабильная биопленка наблюдалась у двухсуточных культур каждого изученного штамма.

Динамика биопленкообразования *B. cereus* изучалась посредством ТЭМ. К 48 ч инкубации в составе биопленки всех изученных штаммов присутствовали клетки в начале споруляции, о чем свидетельствовало наличие электронно-прозрачных гранул полигидроксibuтирата (рис. 2). У обоих эталонных штаммов наблюдались делящиеся, хорошо сохранившиеся бактерии (рис. 2а), и лишь у клинического изолята *B. cereus* 1208/17 обнаруживались сформировавшиеся споры (рис. 2б).

У бактерий всех клинических изолятов форма клеток была изменена, по-видимому, вследствие нарушения ригидности их клеточной стенки: на

рис. 2в представлены искривленные клетки; кроме того, отмечалось присутствие протопластов и лизированных клеток.

Межклеточный матрикс, формирующий консорциум бактериальных клеток и препятствующий оседанию их на дно пробирки, выглядел как межклеточное вещество средней электронной плотности (рис. 2г). Клетки в биопленке не входили в тесный контакт друг с другом и в отдельных случаях были соединены тяжами. В межклеточном пространстве присутствовали фрагменты лизированных клеток, возможно укрепляющие матрикс биопленки, слабо визуализирующийся без специальной окраски (Данилова и др., 2018).

С помощью СЭМ (рис. 3) удавалось наблюдать биопленку *B. cereus*, состоящую из матрикса и погруженных в него бацилл. При этом часть бактерий эталонных штаммов (рис. 3а,б) и клинического изолята *B. cereus* 1208/17 (рис. 3в), находящихся в составе биопленки, имела признаки нарушения деления, выразившиеся в виде клеток непомерно удлиненной формы. Лишь незначительная часть клеток *B. cereus*, как свободно расположенных, так и входящих в состав биопленки, находилась в виде споры (рис. 3а,б,в). Биопленка клинического изолята *B. cereus* 19/16 состояла из бактериальных клеток палочковидной формы, окруженных выраженным слоем экзополисахаридного матрикса; признаков нарушения деления бактерий, а также спор в составе биопленки и вне ее обнаружено не было (рис. 3г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным, штаммы *B. cereus* не способны к эффективной споруляции в условиях плавающей биопленки, что свидетельствует о том, что в жидких средах, в том числе в жидких пищевых продуктах, размножение и биопленкообразование не затруднены. Коль скоро *B. cereus* является широко распространенным возбудителем пищевых отравлений, имитация условий заражения пищевых продуктов и, соответственно, способов защиты от попадания патогенов представляет значительный интерес. Таким образом, плавающая биопленка может рассматриваться как модель развития бацилл в жидких пищевых продуктах: при нарушении правил их хранения бациллы способны формировать плавающую биопленку, состоящую, в основном, из вегетативных токсинпродуцирующих клеток. Как модель для изучения образования биопленки бацилл в естественных условиях плавающая биопленка имеет очевидные преимущества по сравнению с методикой получения биопленок в

пластиковых планшетах (Doyle, 1999). Следует также учесть, что *B. cereus*, вследствие своей способности к образованию биопленки чрезвычайно устойчивая к различным бактерицидным факторам, требует значительных усилий для своей элиминации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Азизбекян Р.Р., Диденко Л.В., Смирнова Т.А. и др. Биопленкообразование и спорообразование *Brevibacillus laterosporus* // Биотехнология. 2014. № 4. С. 28–34.
- Данилова Т.А., Смирнова Т.А., Данилина Г.А. и др. Морфологическое и ультраструктурное исследование особенностей биопленок, формируемых *Streptococcus pyogenes*, методами световой и электронной микроскопии // Бюл. эксперим. биол. 2018. Т. 165. № 1. С. 127–132.
- Смирнова Т.А., Зубашева М.В., Шевлягина Н.В. и др. Электронно-микроскопическое исследование поверхности спор бацилл // Микробиология. 2013. Т. 82. № 6. С. 698–706.
- Aparna M.S., Yadav S. Biofilms: microbes and diseases // Braz. J. Infect. Dis. 2008. V. 12. № 6. P. 526–530.
- Costerton J.W. Introduction to biofilm // Int. J. Antimicrob. Agents. 1999. V. 11. № 3–4. P. 217–221.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. 1999. V. 284. № 5418. P. 1318–1322.
- Doyle R.J. Biofilms. Methods in enzymology. V. 310. N.Y.: Academic Press, 1999. 720 p.
- Ito S., Karnovsky M. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds // J. Cell. Biol. 1968. V. 39. Pt 2. P. 168a–169a.
- Kuroki R., Kawakami K., Qin L. et al. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* // Int. Med. 2009. V. 48. № 10. P. 791–796.
- Liaquat I., Ahmed S.I., Jahan N. Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis* // Int. J. Microbiol. Res. Rev. 2013. V. 1. № 4. P. 61–67.

Electron Microscopic Study of Floating Biofilms Formed by *Bacillus cereus***Z. S. Plieva^a, T. A. Smirnova^a, N. V. Shevlyagina^a, and V. G. Zhukhovitsky^{a, *}**^a*Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Public Health of Russian Federation Moscow, Russia***e-mail: zhukhovitsky@rambler.ru*

The paper presents results of the study of floating biofilms formed by *Bacillus cereus* reference strains and the strains freshly isolated from clinical material by transmission and scanning electron microscopy. Differences in the ultrastructure of the floating biofilms formed by *B. cereus* selected strains are identified. It is shown that *B. cereus* strains are not capable of effective sporulation within a floating biofilm. This study results are indicative of the ability of *B. cereus* to growth and film formation in liquid products. Floating biofilms can be considered as a model of bacilli development in liquid products.

Keywords: biofilmogenesis, sporulation, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy