

УДК 579.841:612.086.3:616.71-002.2

## СТЕРЕОУЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОЧАГА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

Очеретина Р.Ю., Науменко З.С.

Научно-клиническая лаборатория микробиологии и иммунологии ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курган, e-mail: office@ilizarov.ru

Изучены морфологические особенности биопленки бактерий штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus* и смешанной культуры, полученной *in vitro* из этих же штаммов, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом, с помощью сканирующего электронного микроскопа. Бактерии культивировали в жидкой питательной среде (ГРМ-агар) в течение 24 ч. на полистироловой подложке, фиксировали в смеси растворов параформальдегида и глутаральдегида на фосфатном буфере (pH 7,4), промывали, обезжизивали, пропитывали в камфене и высушивали. Установлено, что штаммы рода *P. aeruginosa* имели высокие пленкообразующие свойства. В смешанной культуре (*P. aeruginosa* + *S. aureus*) палочковидные формы преобладали над кокковидными. В условиях *in vitro* через 24 ч культивирования на полистироловой поверхности штаммы родов *Pseudomonas* и *Staphylococcus* формировали бактериальную пленку с выраженными видовыми отличиями, смешанная культура (*P. aeruginosa* + *S. aureus*) – трехмерную структуру биопленки.

**Ключевые слова:** биопленка, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, сканирующая электронная микроскопия

## STEREOULTRASTRUCTURAL SYUDY OF BACTERIAL BIOFILMS OF INFECTED NIDUS IN PATIENTS WIT CHRONIC OSTEOMYELITIS

Ocheretina R.Y., Naumenko Z.S.

Scientific and clinical laboratory of microbiology and immunology Federal State Budgetary Institution Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics Ministry of Health of the Russian Federation, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

Bacterial biofilms of *P. aeruginosa*, *S. aureus* strains and mixture cultures obtained *in vitro* from the same strains isolated in patients with chronic osteomyelitis were morphologically studied using scanning electronic microscope. The bacteria were incubated during 24 hours in liquid nutrient medium (GRM-agar) on polystyrene plates, fixed in mixture paraformaldehyde and glutaraldehyde solution with phosphate buffer pH 7.4, washed, dewatered, soaked in camphene and dried out. *P. aeruginosa* strains were shown to have high biofilm formation characteristics. Mixture cultures (*P. aeruginosa* + *S. aureus*) showed bacilli prevailing over cocci. *Pseudomonas* and *Staphylococcus* strains formed bacterial film with evident specific differences *in vitro* after 24 hours of incubation on polystyrene plates, whereas mixture cultures (*P. aeruginosa* + *S. aureus*) showed three-dimensional biofilm.

**Keywords:** biofilm, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, scanning electronic microscopy

Хронический посттравматический остеомиелит продолжает оставаться актуальной медико-биологической и социальной проблемой. По данным современных исследований установлено, что при хронических формах заболеваний микробной этиологии в организме формируются биопленка [1, 2]. Наиболее часто выделяемыми возбудителями у больных хроническим остеомиелитом являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Формирование биопленок с участием этих микроорганизмов может играть решающую роль в патогенезе остеомиелита. Подавляющее большинство исследований относится к изучению моновидовых биопленок, с использованием светового микроскопа и/или спектрофотометра. Вопросы структурно-функциональных особенностей моновидовых биопленок и межмикробного взаимодействия в многовидовых биопленках остаются недостаточно изученными.

Сканирующая электронная микроскопия, в отличие от традиционных методов исследования биопленок, позволяет использовать более широкий диапазон увеличений, исследовать рельеф объекта, а не только клетки поверхностного слоя [3, 4].

Цель исследования – определить морфологические особенности биопленки бактерий, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом, с помощью сканирующего электронного микроскопа.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили микроорганизмы, выделенные из зоны повреждения кости пациентов с хроническим гнойно-воспалительным процессом в кости, проходивших лечение в «Российском научном центре «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова». В исследовании были включены штаммы *P. aeruginosa*, *S. aureus* и смешанная культура, полученная *in vitro* из этих же штаммов. Видовая принадлежность штаммов установлена с использованием бактериологического ана-

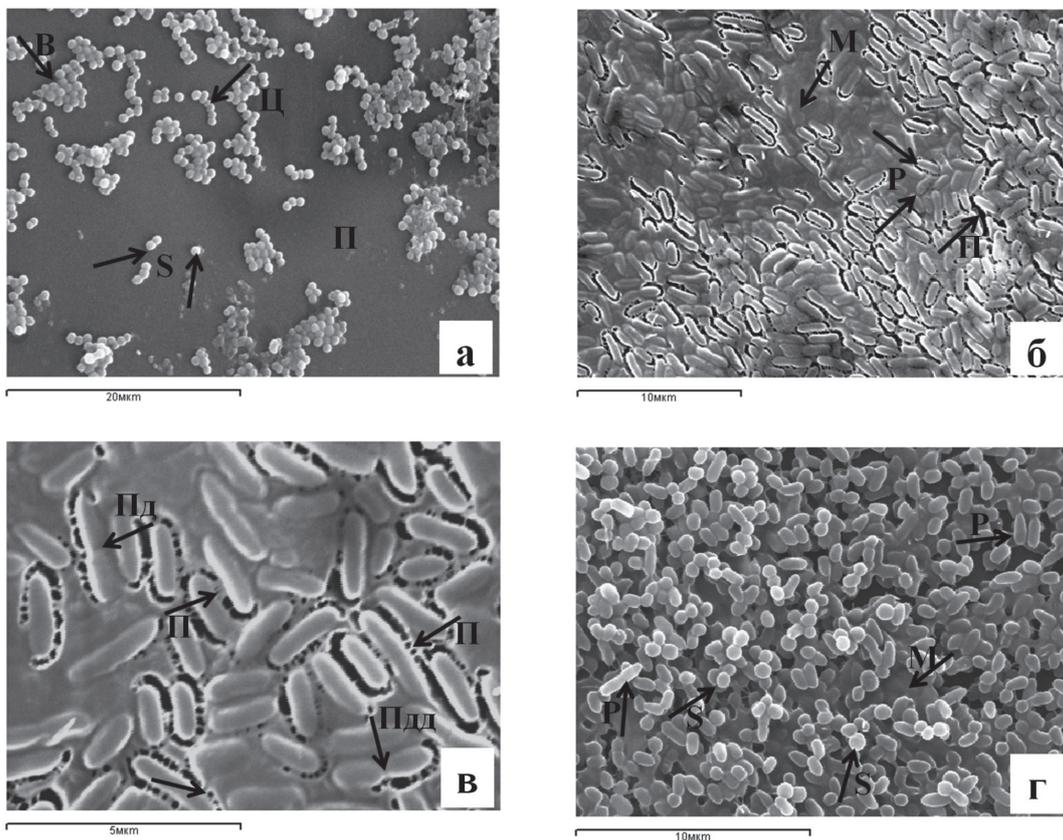
лизатора и микротест систем фирмы «BioMerieux» (Франция). Биопленку получали культивированием бактерий на подложке стерилизованной полистироловой ячейки блистерной упаковки диаметром 3 мм с перфорациями по всему диаметру, погруженной в суспензию микроорганизмов в жидкой питательной среде (ГРМ-агар) в течение суток [5]. После культивирования образец с микроорганизмами на подложке упаковки фиксировали в смеси 2%-х растворов параформальдегида и глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением 0,1% пикриновой кислоты при температуре 4°C. Затем промывали в фосфатном буфере и дистиллированной воде, используя фильтровальную бумагу для удаления раствора через отверстия в ячейке. Обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации, пропитывали в камфене (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) при температуре 60°C. Далее образцы высушивали на воздухе до полной возгонки камфена при комнатной температуре [5]. Монтировали ячейки с бактериями на держатель образца. Затем напыляли серебром в ионном напылителе «IB-6» (JEOL, Япония) и изучали в сканирующем электронном микроскопе «JSM-840» (JEOL, Япония) при инструменталь-

ном увеличении 2500-10000 во вторичных электронах с ускоряющим напряжением 20 keV.

### Результаты исследования и их обсуждение

Через 24 ч. культивирования выявлены микроорганизмы палочковидной (*P. aeruginosa*) и кокковидной формы (*S. aureus*), объединенные секретированными ими полимерами и адгезированными к поверхности ячейки (рис. 1).

Клетки *Staphylococcus* располагались отдельными группами в форме неправильных скоплений (по 4–30 клеток), в том числе напоминающих виноградную гроздь, однослойных цепочек, и редко, одиночных клеток (рисунок, а). Отмечен тесный непосредственный контакт между клетками. Обнаружены единичные двухслойные скопления клеток, объединенные матриксом. Отмечены участки ячейки свободные от бактерий.



Сканограммы штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* выделенных из зоны повреждения кости у пациентов с хроническим остеомиелитом. а) S – одиночные клетки *S. aureus*, B – скопление клеток *S. aureus* «виноградная гроздь», Ц – скопление клеток *S. aureus* в виде цепочки, П – поверхность ячейки, увеличение 2500; б) P – *P. aeruginosa*, М – матрикс, П – поверхность ячейки, увеличение 3000; в) П – перетяжка, Пд – перетяжка делящейся клетки *P. aeruginosa*, Пдд – перетяжка поделившейся клетки *P. aeruginosa*, увеличение 10000; г) S – *S. aureus*, P – *P. aeruginosa*, М – матрикс, увеличение 5000. Фиксация в смеси растворов параформальдегида и глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,4)

Клетки *P. aeruginosa* располагались под различным углом относительно друг друга, образуя сплошной монослой из палочковидных клеток, погруженных в матрикс (рисунок, б). Между клетками выявлены как непосредственные контакты, так и матрикс – опосредованные взаимосвязи. При инструментальном увеличении 10000 выявлены отдельные клетки, которые соединялись между собой перетяжками из структур матрикса, связывающие бактерии друг с другом (рисунок, в). Выявлены *P. aeruginosa*, различные по форме и размеру, а также овальные мелкие клетки, соединенные перетяжкой, характерной для делящихся бинарным путем палочковидных бактерий.

В смешанной культуре *P. aeruginosa* + *S. aureus* отмечено количественное преобладание палочковидных форм над кокковидными (рисунок, г). Обнаружена трехмерная структура, состоящая из нескольких слоев микробных клеток. Палочковидные бактерии, адгезированные к поверхности ячейки, погруженные в матрикс, располагались монослоем. На поверхности этого монослоя выявлены отдельно расположенные клетки *P. aeruginosa* и группы клеток *S. aureus* с преобладанием последних.

**Обсуждение полученных данных.** Анализ полученных данных позволил выявить морфологические особенности ранних моновидовых биопленок золотистого стафилококка и синегнойной палочки из остеомиелитического очага у пациентов с хроническим гнойно-воспалительным процессом. Отмеченное преобладание палочковидных форм на этапе адгезии микроорганизмов к субстрату позволяет предположить, что в условиях *in vitro* адгезия планктонных форм к поверхности полистироловой ячейки блистерной упаковки более выражена у штамма *P. aeruginosa*. Аналогичные данные были получены при исследовании биопленкообразующей способности этого возбудителя другими методами [6].

В смешанной культуре (*P. Aeruginosa* + *S. aureus*) выявленное в биопленке преобладание *P. aeruginosa*, формирующих монослой, вероятно, обусловлено высокими пленкообразующими свойствами штаммов рода *Pseudomonas*. В практической медицине при многократном исследовании пациентов традиционными бактериологическими методами нередко отмечается смена

одного возбудителя другим. У больных хроническим остеомиелитом известны факты выделения *S. aureus* при первом заборе материала и *P. aeruginosa* (или ассоциация бактерий) – при повторном заборе [7]. Формирование трехмерной структуры смешанной бактериальной культурой свидетельствует об активизации процесса пленкообразования бактериями. Межвидовые взаимосвязи в биопленках, образованных различными видами бактерий, требуют дальнейшего изучения. По нашему мнению, в лабораторной практике при проведении исследования бактериальной инфекции у пациентов с хроническим остеомиелитом необходимо учитывать особенности начальных этапов формирования биопленки и межвидовые взаимоотношения микробиоценоза в смешанной культуре.

Таким образом, штаммы родов *Pseudomonas* и *Staphylococcus*, выделенные у пациентов с хроническим остеомиелитом, в условиях *in vitro* через 24 ч культивирования формируют бактериальную пленку на полистироловой поверхности с выраженными видовыми отличиями. Штаммы рода *P. aeruginosa* обладают высокими пленкообразующими свойствами. Смешанная культура (*P. Aeruginosa* + *S. aureus*) образует трехмерную структуру биопленки через 24 ч.

#### Список литературы

1. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009; 11(7): 1034–43.
2. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Ильина Т.С. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2006; 3: 22-9.
3. Коннов Н.П., Волков Ю.П., Корсакова А.Ю., Данилова Т.В., Микшис Н.И., Мантуров А.О., Кузнецов О.С., Попов Ю.А., Киреев М.Н. Трансмиссионная электронная и сканирующая зондовая микроскопия белков S-слоя сибирезявного микроба. Проблемы особо опасных инф. 2004; 2(88): 34-6.
4. Stukalov O., Korenevsky A., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2008; 74(17): 5457-65.
5. Науменко З.С., Очеретина Р.Ю. Способ подготовки образцов биопленок микроорганизмов для исследования в сканирующем электронном микроскопе. Патент 2484446, РФ; 2011.
6. Науменко З.С., Шипицина И.В. Сравнительная оценка адгезивной активности бактерий, выделенных у больных из остеомиелитического очага из ран открытых переломов. *Гений ортопедии.* 2011; 4: 31-4.
7. Науменко Z.S., Розова Л.В., Годовых Н.В., Ключин Н.М. Сравнительная характеристика возбудителей хронического остеомиелита в зависимости от локализации гнойного процесса. *Гений ортопедии.* 2010; 4: 55-8.