

Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко, Н.А.Видяева, В.В.Кутырев

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОПЛЕНКА И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ ОБРАЗОВАНИЯ
У ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ И ДРУГИХ ПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЙ**

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре представлены современные литературные данные об общих закономерностях образования бактериальных биопленок, этапах ее формирования и структурно-функциональной организации, а также об участии различных ферментных систем в функционировании биопленки. Проведен анализ сведений об особенностях образования биопленок патогенными иерсиниями – *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Представлены данные об участии генов *hmsHFRS*-оперона хромосомной области пигментации *Y. pestis* в формировании структуры биопленки и ее регуляции генами *hmsP* и *hmsT*. Обобщены результаты исследований последних лет, посвященные генетической детерминированности процессов образования биопленки возбудителем чумы, в частности участие генов синтеза липополисахарида (*waaA*, *yrbH* и *gmhA*) и полиаминов (*speA* и *speC*), а также регуляторных генов *rcaA* и *phoP-phoQ*. Приведены результаты собственных исследований по изучению особенностей формирования биопленки штаммами возбудителя чумы разных подвидов на абиотических поверхностях и модели нематоды *Caenorhabditis elegans*. Обсуждена роль биопленки в сложном жизненном цикле возбудителя чумы, отмечено ее значение не только для обеспечения трансмиссии чумы с помощью блох, но и для сохранения *Y. pestis* во внешней среде вне организма теплокровного хозяина.

Ключевые слова: биопленка, возбудитель чумы, патогенные иерсинии.

L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko, N.A.Vidyaeva, V.V.Kutyrev

Bacterial Biofilm and Peculiarities of Its Formation in Plague Agent and in Other Pathogenic *Yersinia*

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

This paper represents a review of the current literature data concerning general principles of bacterial biofilm formation, stages of biofilm production and its structural and functional organization, as well as the data concerning involvement of different enzyme systems with the process of biofilm functioning. Carried out is the analysis of the data on the peculiarities of biofilm formation by pathogenic *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*. Displayed are the data on the role of *hmsHFRS*-operon genes, located in pigmentation chromosomal region of *Y. pestis*, in the process of biofilm structure formation, and the data on its regulation by *hmsP* and *hmsT* genes. Summarized are the results of the recent years' investigations devoted to the genetic determinancy of the plague agent biofilm formation processes, and in particular to the involvement of genes encoding synthesis of lipopolysaccharide (*waaA*, *yrbH* and *gmhA*) and polyamines (*speA* and *speC*), as well as *rcaA* and *phoP-phoQ* regulatory genes with biofilm formation procedures. Represented are the results of our own investigations concerning the studies of peculiarities of biofilm formation by plague agent strains of different subspecies on the abiotic surfaces and on the nematode model – *Caenorhabditis elegans*. Discussed is the role of the biofilm in the complex life span of the plague agent. Noted is biofilm significance not only for facilitation in plague transmission by fleas, but also for *Y. pestis* preservation in the environment, out of the organism of a warm-blooded host.

Key words: biofilm, plague agent, pathogenic *Yersinia*.

Согласно современным представлениям бактерии способны существовать как в виде свободноживущих планктонных клеток, так и в виде биопленок. J.Costerton *et al.* [15] определили биопленку как «структурированное сообщество бактериальных клеток, которые прикреплены к инертной или живой поверхности и окружены образуемым ими полимерным матриксом». Показано, что свыше 90 % бактерий могут формировать биопленки на различных типах поверхностей, а некоторые из них образуют биопленки и в условиях макроорганизма [14]. Свойства свободноживущих планктонных клеток и бактерий, входящих в биопленку, существенно различаются. Бактериальные клетки в составе биопленки обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе к воздействию различных антимикробных агентов [25].

Большинство хронических инфекционных заболеваний человека и животных, с трудом поддающихся лечению лекарственными препаратами, как правило, вызваны биопленками патогенных бактерий [14].

В основе формирования биопленки лежат три ведущих механизма, которые зависят от вида микроорганизма, природы колонизируемой поверхности, физических и химических параметров окружающей среды [24]. Один из этих механизмов заключается в колонизации поверхности за счет движения по ней прикрепившихся клеток. Второй механизм обусловлен делением прикрепившихся клеток и их распространением в различные стороны от места прикрепления. И, наконец, пополнение клеточной массы биопленок может происходить за счет бактерий, циркулирующих в окружающей жидкости [25].

В качестве сигналов, обуславливающих вклю-

чение у планктонных бактерий механизмов перехода от свободного состояния к оседлому существованию на соответствующей поверхности, выступают изменения в содержании питательных веществ, железа и кислорода, температуры, осмолярности, pH среды и т.д. [38, 42].

Формирование биопленки проходит через ряд последовательных этапов, включающих прикрепление планктонных бактерий к поверхности, пролиферацию и последующее накопление массы клеток в виде многослойной структуры, содержащей синтезируемый самими клетками полимерный внеклеточный матрикс. По мере созревания биопленки некоторые бактерии открепляются и колонизируют новые поверхности. Структура биопленки регулируется как физико-химическими взаимодействиями с факторами внешней среды, так и генетическими механизмами самих бактерий [40].

Прикрепление к поверхности. Первым этапом в формировании биопленки является адгезия бактериальных клеток к биотической или абиотической поверхности [38]. Первичный контакт планктонного микроорганизма и поверхности происходит либо случайно (например, при пассивной миграции клеток с током жидкости), либо вследствие направленного движения, обусловленного хемотаксисом. Стадия первичной адгезии занимает несколько секунд, является обратимой и зависит от неспецифических физико-химических механизмов взаимодействия (гидрофобные и электростатические силы, стерическое соответствие молекул и т.д.) между поверхностными структурами микроорганизма и самого субстрата [37]. Вторая стадия адгезии характеризуется необратимым связыванием бактериальных клеток с поверхностью при помощи специфических молекул – адгезинов. Важную роль на этом этапе играют такие клеточные структуры, как фимбрии, поверхностные белки, липополисахарид и жгутики [24].

При переходе от планктонного к оседлому состоянию у бактерий происходит изменение многих процессов жизнедеятельности. Так, прикрепление к поверхности изменяет экспрессию почти 40 % бактериальных генов, участвующих в процессах мембранного транспорта, секреции, синтеза фосфолипидов и липополисахарида, регуляции генов [43]. При этом может происходить как активирование экспрессии генов (например, поринов), так и их репрессия (гены жгутикообразования) [24].

Созревание биопленки. Через некоторое время после необратимого прикрепления к поверхности, бактерии теряют подвижность, слипаются друг с другом, образуя многоклеточный слой. При достижении толщины слоя клеток более 10 мкм наступает следующая стадия, обозначаемая как стадия созревания биопленки [38].

Основной структурной единицей биопленки является микроколония, которая представляет собой многоклеточное образование толщиной в 3–5 слоев, образующееся после адгезии бактерии к поверхно-

сти [37]. При этом бактериальные клетки составляют не более 15 % объема биопленки, остальное представляет экзополисахаридный матрикс, который включает клеточные остатки и внеклеточную ДНК [38]. Микроколонии постепенно увеличиваются в размерах и объединяются с образованием макроколоний. Кроме микроколоний, в сложной трехмерной архитектуре биопленки в большом количестве встречаются поры и каналы, по которым осуществляется приток воды, питательных веществ и кислорода и выведение конечных продуктов метаболизма [43].

Ключевая роль в функционировании бактериальной биопленки принадлежит сигнальной молекуле c-di-GMP – циклическому димерному гуанозин монофосфату [16]. Уровень биосинтеза этой молекулы в клетке зависит от действия двух ферментов – дигуанилатциклазы и фосфодиэстеразы, содержащих, соответственно, GGDEF и EAL домены. Белки, включающие GGDEF- и EAL-домены, обнаружены исключительно у бактерий [34]. Большинство белков с GGDEF- и EAL-доменами участвуют не только в формировании биопленки, но и в процессах дифференцировки, подвижности, фотосинтеза и проявления вирулентности бактерий [41]. Эти белки составляют сложную бактериальную систему сигнальной трансдукции, обеспечивающую синтез молекулы-посредника – c-di-GMP [16].

Структуру биопленки в значительной мере определяет внеклеточное полимерное вещество или матрикс. «Экзополисахаридный матрикс» это общий термин, объединяющий большое разнообразие таких химических соединений, как экзополисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества [37]. Подавляющее большинство бактерий в составе экзополисахарида содержат линейный гомогликан β -1,6-N-ацетилглюкозамин или целлюлозу [34]. Некоторые микроорганизмы синтезируют несколько экстраклеточных полисахаридов, в том числе β -1,6-N-ацетилглюкозамин, целлюлозу, колановую кислоту [37].

Характерной особенностью биопленок, образуемых различными видами бактерий, является присутствие поверхностных белков, получивших название Вар-белков (biofilm associated proteins) [35]. Общими особенностями этой группы белков являются их высокий молекулярный вес, наличие сходных коровых доменов [34].

Потенциал роста любой биопленки ограничен доступностью питательных веществ и кислорода, перфузией их в различные слои биопленки и эффективностью удаления отходов, содержанием ионов водорода (pH среды), осмолярностью и т.д. [15].

Открепление (рассеивание) клеток. В определенный момент времени биопленка достигает критической массы и возникает динамическое равновесие, при котором от наружных слоев, наиболее удаленных от поверхности, начинают открепляться клетки, способные покидать биопленку и колонизировать другие поверхности [25]. Открепление бактерий от

био пленки может быть обусловлено как внешними (движение жидкости), так и внутренними (энзиматическая деградация β -1,6-N-ацетилглюкозамина или поверхностно связанных белков) причинами [43]. Открепление клеток от био пленки может происходить посредством освобождения индивидуальных клеток или их агрегатов в окружающую среду, а также перемещением био пленки по поверхности [24].

Формирование био пленки является составной частью жизненного цикла большинства микроорганизмов. Особое значение имеет изучение образования био пленки патогенными бактериями, поскольку формирование био пленки на внутренних поверхностях макроорганизмов приводит к развитию таких болезней как эндокардиты, остеомиелиты, отиты, периодонтиты, простатиты и пневмонии [25]. Формирование био пленки не обязательно связано с вирулентностью, т. к. многие непатогенные бактерии также обладают этим свойством, однако наличие такой активности способствует выживанию возбудителей как во внешней среде, так и в организме хозяина. Способность вызывать заболевания бактериями, находящимися в форме био пленки, установлена для различных видов *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Mycobacterium*, *Bacillus* и др. [14].

Важную роль био пленка играет и в жизнедеятельности патогенных видов бактерий рода *Yersinia* – *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, которые являются возбудителями болезней человека и других млекопитающих. Характерной особенностью возбудителя чумы *Y. pestis* является его чрезвычайная вирулентность и специфический способ передачи возбудителя, осуществляемый при участии насекомых [1]. *Y. pestis* обладает уникальной, не встречающейся у других бактерий, способностью использовать био пленку для трансмиссии с помощью инфицированных блох.

Особенности формирования био пленки патогенными йерсиниями. Возбудитель чумы *Y. pestis* является ветвью эволюции псевдотуберкулезного микроба, от которого он произошел относительно недавно [10]. Тем не менее, многие свойства, в том числе и способность к образованию био пленки, претерпели у чумного микроба значительные изменения.

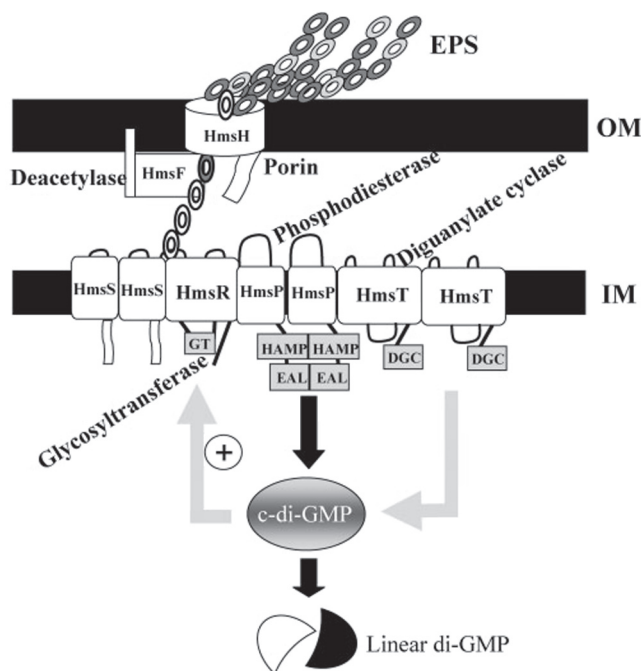
Псевдотуберкулезный микроб, повсеместно распространенный в окружающей среде, в частности, в почве и воде, использует способность к образованию био пленки для переживания неблагоприятных внешних воздействий и для защиты от поедания беспозвоночными хищниками. У возбудителя чумы, ведущего паразитическое существование, способность к образованию био пленки необходима для выживания в пищеварительном тракте насекомого-переносчика и накопления микробной массы, фрагменты которой попадают в организм теплокровного хозяина при укусе блохи. Таким образом, в процессе внутривидовой эволюции чумной микроб адаптировал способность к образованию био пленки для выработки принципиально нового

способа передачи инфекции – через укус блохи, содержащей сформированную био пленку.

Генетические механизмы образования био пленки у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. Структурными генами образования био пленки у возбудителя чумы являются гены хромосомного оперона *hmsHFRS* (9,1 т.п.н.) – *hmsH*, *hmsF*, *hmsR* и *hmsS* (hemin storage), расположенного в хромосомной области пигментации, имеющей размер 102 т.п.н. [12, 26, 32, 33, 36]. Ранее хромосомный *hmsHFRS* оперон связывали с адсорбцией гемина и Конго красного на внешней мембране клеток *Y. pestis* при 26 °С, но не 37 °С [28, 36]. Сейчас степень связывания красителей рассматривают как меру синтеза экзополисахарида при формировании био пленки возбудителем чумы [12, 32]. За регуляцию образования Hms-зависимой био пленки отвечают гены *hmsT* и *hmsP*, расположенные за пределами *hmsHFRS* оперона [32, 40].

Структура и функции генов *hmsHFRS* оперона. Белки, детерминированные генами *hmsHFRS* оперона, являются компонентами наружной (HmsH и HmsF) и внутренней (HmsR, HmsS) мембран клетки возбудителя чумы (рисунок) [40].

HmsH, предположительно, выполняет функцию порина, через который poly- β -1,6-GlcNAc (поли β -1,6-N-ацетилглюкозамин) экспортируется на поверхность бактерии [22, 32, 36, 40]. HmsF является липопотеином, обладает деацетилазной активностью и, по-видимому, участвует в модификации экстраклеточного полисахаридного матрикса био пленки, обеспечивая электростатическое взаимодействие с негативно заряженной поверхностью клетки [22, 48]. Комплекс белков HmsR и HmsS обладает гликозилтрансферазной активностью и является ключе-



Модель образования Hms-зависимой био пленки *Y. pestis* [33]: EPS – экстраклеточный матрикс (экзополисахарид); OM – наружная мембрана; IM – внутренняя мембрана; GT – гликозилтрансфераза; DGC – дигуанилатциклаза; «+» – стимуляция энзиматической активности HmsR со стороны c-di-GMP

вым элементом в биосинтезе биопленки [12, 22].

К настоящему времени полный биохимический и структурный анализ экзополисахарида *Y. pestis* пока не осуществлен, поэтому существует возможность присутствия в матриксе биопленки возбудителя чумы не только poly- β -1,6-GlcNAc, но и других полимеров.

Белки HmsT и HmsP контролируют Hms-зависимый биосинтез внеклеточного матрикса биопленки через противоположно направленное влияние на содержание c-di-GMP [11, 12, 32, 41]. HmsP и HmsT являются белками внутренней мембраны. Активный центр белка HmsP находится в цитоплазме на С-конце и содержит EAL-домен, который необходим для фосфодиэстеразной активности в отношении регуляторной молекулы – бис-(3'-5')-циклический димерный гуанозин монофосфат (c-di-GMP) [11, 32]. Цитоплазматический С-конец белка HmsT содержит GDDEF-домен, определяющий проявление дигуанилатциклазной активности этого фермента [12, 40]. Методами биохимического и генетического анализа показано существование взаимодействий между Hms белками внутренней мембраны – HmsT, HmsP, HmsR и HmsS [12].

Таким образом, Hms система *Y. pestis*, аналогично другим грамотрицательным бактериям, таким как *Salmonella*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Vibrio*, использует GGDEF- и EAL-доменные белки для контроля концентрации молекулы c-di-GMP, участвующей в регуляции синтеза экзополисахарида биопленки [16]. Полученные данные о значении генов *hmsT* и *hmsP* позволили высказать гипотезу о том, каким образом происходит регуляция образования биопленки.

Белки HmsR, HmsS, HmsT и HmsP формируют во внутренней мембране энзиматический комплекс. HmsR в ассоциации с HmsS осуществляют синтез поли-1,6-N-ацетилглюкозамина, а HmsP и HmsT регулируют этот процесс путем контроля уровня c-di-GMP [12]. В блохах при температуре 26 °C происходит увеличение уровня c-di-GMP, обусловленное действием HmsT. Это вызывает активизацию фермента HmsR, синтез поли-1,6-N-ацетилглюкозамина, формирование биопленки и переход к стадии блокирования блох. Блокированные блохи способны к эффективной передаче чумы млекопитающим. В организме млекопитающих при температуре 37 °C происходит дегградация HmsT специфическими протеазами (Lon, ClpP и/или ClpX), а также повышение фосфодиэстеразной активности HmsP, что вызывает снижение уровня c-di-GMP и приводит к ингибированию образования биопленки в организме теплокровных животных [13]. Таким образом, в организме млекопитающих возбудитель чумы существует не в виде биопленки, а в виде свободно живущих бактерий, которые распространяются по организму хозяина и синтезируют поверхностно расположенные факторы вирулентности (белковая капсула FraI, протеаза Pla), препятствующие действию защитных сил теплокровного хозяина.

Участие других генов в образовании биопленки возбудителем чумы. Образование биопленки – это сложный физиологический процесс, в котором участвуют не только гены *hms* оперона. Так, показано, что на формирование биопленки влияет липополисахарид (ЛПС) – основной компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Мутации в генах *waaA*, *yrbH* и *gmhA*, кодирующих ферменты биосинтеза компонентов ЛПС, приводят к снижению образования биопленки у *Y. pestis*, причем *gmhA* мутанты практически не способны блокировать блох, что обусловлено, вероятно, уменьшением продукции экзополисахарида, а не изменениями его структуры [18, 47]. Влияние генов *waaA* и *gmhA* на формирование биопленки вызвано, вероятно, изменением транспорта экзополисахарида через наружную мембрану клетки, компонентом которой является ЛПС [18, 47]. Ген *yrbH* детерминирует синтез полифункционального белка YrbH, участвующего в биосинтезе липополисахарида, а один из его функциональных доменов, по-видимому, является негативным регулятором биопленки [47].

Установлено, что в образовании биопленки участвуют продукты генов *speA* (аргининдекарбоксилаза) и *speC* (орнитиндекарбоксилаза), детерминирующих образование полиаминов (спермидина и путресцина). Мутации в этих генах приводят к утрате способности формировать биопленку клетками *Y. pestis* [39]. В отсутствие полиаминов снижается уровень биосинтеза ключевых Hms белков – HmsR, HmsS и HmsT на 93, 43 и 90 % соответственно. При этом отсутствие полиаминов не влияет на инициацию транскрипции или стабильность иРНК, а их функция связана с регулированием трансляции HmsR и HmsT [50].

Недавно было выявлено влияние на формирование биопленки возбудителем чумы продукта гена *yapC* – аутотранспортного белка YapC, способного, по-видимому, осуществлять функцию адгезина [21].

Эволюционное становление жизненного цикла, связанного со сменой организмов теплокровного и холоднокровного животного, привело к изменению у возбудителя чумы ряда регуляторных систем. Так, выявлены существенные изменения в системе фосфорилирования Rcs, которая у бактерий контролирует экспрессию генов в ответ на такие внешние сигналы, как изменения температуры и осмолярности. У возбудителя чумы, в отличие от его эволюционного предшественника *Y. pseudotuberculosis*, выявлена мутация в гене *rcaA* – отрицательном регуляторе образования биопленки, что привело к его превращению в псевдоген и способствовало накоплению массивной биопленки в пищеварительном тракте блох [44]. Такое генетическое событие обеспечило (наряду с приобретением плазмиды pFra, необходимой для выживания *Y. pestis* в блохах) освоение возбудителем чумы новой экологической ниши – пищеварительного тракта блохи и осуществление эффективной трансмиссии с помощью блох.

Изучено участие в формировании биопленки регуляторной (двухкомпонентной) системы PhoP-PhoQ, которая обуславливает ответные реакции микроорганизма на содержание во внешней среде ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и способствует выживанию чумного микроба внутри макрофагов [23, 45]. Делеция в гене *phoP* приводит к существенному увеличению толщины образуемой клетками биопленки и прочности ее связывания с поверхностью, что свидетельствует об участии продукта гена *phoP* в негативной регуляции формирования биопленки. Кроме того, показано влияние белка PhoP на функционирование дигуанилатциклазы HmsT [45]. Обнаружение регуляторной роли PhoP хорошо согласуется с двухфазным жизненным циклом возбудителя чумы. Во время развития инфекции в организме млекопитающих PhoP позитивно регулирует гены, обеспечивающие выживание бактерий и вирулентность, и подавляет формирование биопленки, которая не нужна возбудителю в организме теплокровного хозяина [23, 45].

Особенности формирования биопленки у чумного микроба на различных поверхностях. Исследование процесса формирования биопленки и образования блока в преджелудке блохи представляет собой довольно сложную задачу из-за микроскопических размеров пищеварительного тракта насекомого-переносчика и недостаточно разработанных методов генетического анализа насекомых.

Были предприняты попытки изучения формирования биопленки *in vitro* при использовании боросиликатного стекла, различных типов пластиковых поверхностей [5, 11, 19, 29]. Показана способность возбудителя чумы образовывать на этих абиотических поверхностях видимую биопленку и установлена корреляция этого признака с формированием пигментированных колоний на средах с гемином или Конго красным.

Способность к образованию биопленки на биотической поверхности исследуют на модели нематоды *Caenorhabditis elegans*. Неприхотливость к условиям выращивания, высокая скорость генерации, а также хорошо развитая методология генетических и молекулярных исследований и полностью секвенированный геном делают модель *C. elegans* очень удобной для изучения образования биопленки возбудителем чумы.

Показано, что клетки *Y. pestis* образуют на голове и верхней части туловища нематоды *C. elegans* бактериальную биопленку, которая эффективно блокирует питание этого беспозвоночного животного, что поразительно похоже на поведение *Y. pestis* в блохах.

В составе биопленки, образуемой возбудителем чумы на поверхности нематоды, как и в организме блох, выявлен полисахарид [46, 47]. Формирование биопленки на поверхности *C. elegans*, как блокирование блох, строго коррелирует с фенотипом пигментации и требует участия в этом процессе продуктов оперона *hmsHFRS* [4, 17]. У штаммов *Y. pestis*, формирующих биопленку на кутикуле *C. elegans*, выяв-

лены интактные гены *gmhA*, *speA* и *speC*, ассоциируемые с проявлением способности к образованию биопленки в блохах [4].

Сравнительное изучение образования биопленки у штаммов основного и неосновных подвидов. Согласно отечественной схеме внутривидовой классификации вид *Y. pestis* представлен пятью подвидами: основным и 4 неосновными (кавказским, алтайским, гиссарским, улегейским) [7]. Большинство штаммов основного подвида обладают высокой вирулентностью и высоким эпидемическим потенциалом, в то время как штаммы неосновных подвидов имеют избирательную вирулентность и низкий эпидемический потенциал.

Образование биопленки штаммами основного подвида *Y. pestis* и генетические основы этого процесса достаточно хорошо изучены [4, 6, 17, 18, 20, 30, 46, 47]. Способность неосновных подвидов к формированию биопленки оставалась до недавнего времени практически не исследованной. Нами изучены особенности формирования биопленки штаммами *Y. pestis* разных подвидов [5, 8, 20]. В результате впервые установлено, что большинство изученных штаммов неосновных подвидов формируют на различных типах поверхностей (биотические и абиотические) хорошо сформированную биопленку, наличие которой четко коррелирует с фенотипом пигментации [5].

При изучении генов, участвующих в синтезе и регуляции образования биопленки, выявлено наличие у неосновных подвидов генов *hmsHFRS* оперона, регуляторных генов *hmsT* и *hmsP*, генов *gmhA* (биосинтез гептозы), *speA* и *speC* (синтез полиаминов) [5]. В гене *rscA* (негативный регулятор образования биопленки в блохах) у всех изученных штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, в отличие от штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выявлено наличие вставки размером 30 п.н. (с 294 по 323 п.н. от начала гена), которая приводит к нарушению структуры гена и способствует формированию массивной биопленки в пищеварительном тракте блохи [5]. Полученные данные свидетельствуют о том, что становление способности к образованию биопленки в блохах произошло уже на ранних этапах эволюции вида *Y. pestis* и обеспечило развитие нового механизма передачи инфекции – трансмиссии с помощью беспозвоночных животных.

Роль биопленки в сложном жизненном цикле возбудителя чумы. Биопленка, по-видимому, играет важную роль не только в обеспечении трансмиссии чумы с помощью блох, но и в сохранении возбудителя во внешней среде вне организма теплокровного хозяина. До сих пор многое в сложном жизненном цикле *Y. pestis* остается неясным, в том числе не установлены способы сохранения возбудителя в периоды между эпизоотиями, которые часто бывают очень длительными и занимают до нескольких десятков лет. Все больше данных свидетельствуют в пользу того, что значимую роль в сохранении возбудителя чумы играют беспозвоночные животные – члены сложного биоценоза, в котором существует возбу-

дитель чумы. Общеизвестным является механизм длительного сохранения *Y. pestis* в виде биопленок в пищеварительном тракте переносчиков – блох. В организме заблокированной блохи чумной микроб может сохраняться достаточно долго – до нескольких месяцев [2]. Кроме того, сами заблокированные блохи способствуют диссеминации возбудителя, рассеивая фрагменты биопленки во внешнюю среду. Показано, что в условиях эксперимента в составе конгломератов биопленок с остатками кровяной пищи – «глыбок» – возбудитель чумы сохранял свою жизнеспособность в течение 7 лет наблюдения [3].

В сохранении возбудителя чумы во внешней среде, вероятно, принимают участие и члены почвенного биоценоза – нематоды и простейшие. В экспериментальных условиях показано, что чумной микроб может сохраняться в цистах простейших, а нематоды способствуют переносу клеток *Y. pestis* [6, 9]. Описан механизм вертикальной передачи возбудителя чумы из почвы в организм теплокровных животных, который происходит с участием паразитических нематод, способных переносить фрагменты биопленок в пищеварительный тракт блохи, заражая насекомых, обеспечивающих последующее инфицирование грызунов [8]. Перенос осуществляется по схеме: биопленки *Y. pestis* – личинки паразитических нематод – личинки блох – куколки блох – имаго блох – зараженные грызуны. Этот механизм удовлетворительно объясняет быстрое, иногда взрывное, начало эпизоотий чумы, которые начинаются одновременно на больших территориях природного очага. Наличие только заблокированных блох не может обеспечить такого быстрого начала эпизоотий чумы. Они играют важную роль в последующем развитии эпизоотий и в долговременном сохранении возбудителя в составе биопленок.

Таким образом, биопленки играют важную роль в жизненном цикле возбудителя чумы, однако их истинное значение еще предстоит выяснить.

Особенности формирования биопленки штаммами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Экспериментально показано, что штаммы возбудителя псевдотуберкулеза, как и *Y. pestis*, способны образовывать биопленку на абиотических поверхностях и кутикуле головной части нематоды *C. elegans*, что препятствует поеданию бактерий беспозвоночными животными [4, 5, 17, 19, 30]. Однако выявлены и существенные различия в формировании биопленки этими близкородственными бактериями [16, 28]. Так, по данным G. Joshua *et al.* [30] большинство штаммов *Y. pseudotuberculosis* не способны блокировать нематод в лабораторных условиях. Из 41 изученного ими штамма возбудителя псевдотуберкулеза, относящегося к 21 серовару, 76 % не образовывали биопленку на кутикуле нематод. Также установлено, что *Y. pseudotuberculosis* никогда не образует биопленку в преджелудке блохи, хотя на некоторое время может колонизировать его [2, 19].

Y. pseudotuberculosis, так же как и *Y. pestis*, содержит оперон *hmsHFRS*, детерминирующий биосинтез

экзополисахарида, а также регуляторные гены *hmsT* и *hmsP*, необходимые для формирования биопленки на абиотических и биотических поверхностях [17, 26, 29]. Высказано предположение о том, что различия в образовании биопленки между двумя видами *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* существуют не на уровне структуры экзополисахарида, а затрагивают процессы регуляции [20, 27]. В пользу этого предположения свидетельствуют экспериментальные данные о влиянии регуляторных генов *flhDC* и *rcaA* на способность *Y. pseudotuberculosis* образовывать биопленку на абиотической и биотической поверхностях [44, 49].

Способность к формированию биопленки у возбудителя кишечного иерсиниоза – *Y. enterocolitica* практически не изучена. По-видимому, биопленка *Y. enterocolitica* не является фактором его вирулентности, а способствует выживанию этого возбудителя во внешней среде, что подтверждает его способность к длительному сохранению в почве и воде. Показано, что образование биопленки клетками *Y. enterocolitica* зависит от наличия жгутиков, поскольку мутанты, лишенные жгутиков, дефектны по образованию биопленки из-за неспособности осуществлять эффективную адгезию к поверхности [31]. Различия в формировании биопленки клетками *Y. pestis* и *Y. enterocolitica*, по-видимому, связаны с особенностями *hms* оперонов этих возбудителей, поскольку у возбудителя иерсиниоза были выявлены гены *hmsHFRS* и *hmsP*, но *hmsT* не обнаружен [31].

Проведенный анализ литературных данных и результатов собственных исследований позволяет заключить, что образование биопленок является сложным динамическим процессом, который регулируется многоуровневыми механизмами и обеспечивает соответствие метаболических процессов бактерий условиям их существования. Способностью к образованию биопленок обладают как патогенные, так и непатогенные бактерии, причем и те и другие используют ее для защиты от агрессивных воздействий среды обитания – иммунной системы хозяина или факторов внешней среды. В сложном жизненном цикле возбудителя чумы биопленка играет роль в обеспечении его трансмиссии с помощью беспозвоночных животных, а также в сохранении во внешней среде вне организма теплокровных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бибикина В.А., Классовский Л.Н. Передача чумы блохами. М.: Медицина; 1974. 187 с.
2. Ващенко В.С. Блохи – переносчики возбудителей болезней человека и животных. Л.: Наука; 1988. 163 с.
3. Величко Л.Н., Кондрашкина К.И., Ермилов А.П. и др. Экскременты блох – естественная среда долговременного хранения микроба чумы. Пробл. особо опасных инф. 1978; 6(64):51–4.
4. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю. и др. Формирование биопленки штаммами *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *Caenorhabditis elegans*. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):31–4.
5. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю. и др. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 5:13–19.
6. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М. и др. Изучение

- образования биопленки у штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в 2009 г. в Астраханской области. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 3:3–7.
7. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. Пробл. особо опасных инф. 1998; 78:11–17.
8. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В. и др. Молекулярные основы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2009; 4:6–13.
9. Никульшин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М. и др. Изучение ассоциаций почвенных амёб *Hartmannella rhyssodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 9–10:2–5.
10. Achtmann M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96(24):14043–8.
11. Bobrov A., Kirillina O., Perry R. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 247:123–30.
12. Bobrov A., Kirillina O., Forman S. et al. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. Environ. Microbiol. 2008; 10(6):1419–32.
13. Bobrov A., Kirillina J., Ryjenkov D. et al. Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 2011; 79(2):533–51.
14. Bryers J. Medical biofilms. Biotechnol. Bioeng. 2008; 100(1):1–18.
15. Costerton J., Stewart P., Greenberg E. Bacterial biofilms: a common case of persistent infections. Science. 1999; 284:1318–22.
16. Cotter P., Stibitz S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. Curr. Opin. Microbiol. 2007; 10:17–23.
17. Darby C., Hsu J., Ghorri N. et al. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. Nature. 2002; 417:243–4.
18. Darby C., Ananth S., Tan L. et al. Identification of gmhA, a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage, by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm system. Infect. Immun. 2005; 73(11): 7236–42.
19. Erickson D., Jarrett C., Wren B. et al. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 2006; 188: 1113–9.
20. Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutyrev V.V. Comparative analysis of biofilm formation by main and nonmain subspecies *Yersinia pestis* strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010; 59:513–520.
21. Felek S., Lawrenz M., Krukoni E. The *Yersinia pestis* autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. Microbiology. 2008; 154:1802–12.
22. Forman S., Bobrov A., Kirillina O. et al. Identification of critical amino acid residues in the plague biofilm Hms proteins. Microbiology. 2006; 152:3399–410.
23. Grabenstein J., Fukuto Y., Palmer L. et al. Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. Infect. Immun. 2006; 74:3727–41.
24. Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Microbiology. 2004; 2:95–108.
25. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell. Microbiol. 2009; 11(7):1034–43.
26. Hinnebusch J., Perry R., Schwan T. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. Science. 1996; 273:367–70.
27. Hinnebusch J., Erickson D. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008; 322:229–48.
28. Jackson S., Burrows T. The pigmentation of *Pasteurella pestis* on a defined medium containing haemin. Brit. J. Exp. Pathol. 1956; 37:570–6.
29. Jarrett C., Deak E., Isherwood K. et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. J. Infect. Dis. 2004; 190:783–92.
30. Joshua G., Karlyshev A., Smith M. et al. *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. Microbiology. 2003; 149:3221–9.
31. Kim T., Young B., Young G. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74(17):5466–74.
32. Kirillina O., Fetherston J., Bobrov A. et al. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 2004; 54(1):75–88.
33. Khweek A., Fetherston J., Perry R. Analysis of HmsH and its role in plague biofilm formation. Microbiology. 2010; 156:1424–38.
34. Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. Intern. Microbiol. 2006; 9:21–8.
35. Lasa I., Penades J. Vap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. Res. Microbiol. 2006; 157:99–107.
36. Lillard J., Fetherston J., Pedersen L. et al. Sequence and genetic analysis of the haemin storage (hms) system of *Yersinia pestis*. Gene. 1997; 193:13–21.
37. Monds R., O'Toole G. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol. 2009; 17(2):73–87.
38. O'Toole G., Kaplan Y., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000; 54:49–79.
39. Patel C., Wortham B., Lines J. et al. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. J. Bacteriol. 2006; 188:2355–63.
40. Perry R., Bobrov A., Kirillina O. et al. Temperature regulation of the hemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. J. Bacteriol. 2004; 186:1638–47.
41. Simm R., Fetherston J., Fader A. et al. Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. J. Bacteriol. 2005; 187(19):6816–23.
42. Stanley N., Lazazzera B. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Mol. Microbiol. 2004; 52(4):917–24.
43. Stoodley P., Sauer R., Davies D. et al. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 2002; 56:187–209.
44. Sun Y., Hinnebusch J., Darby C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105(23):8097–101.
45. Sun Y., Koumoutsi A., Darby C. The response regulator PhoP negatively regulates *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 2009; 290:85–90.
46. Tan L., Darby C. A movable surface: formation of *Yersinia sp.* biofilms on motile *Caenorhabditis elegans*. J. Bacteriol. 2004; 186:5087–92.
47. Tan L., Darby C. *Yersinia pestis* YrbH is a multifunctional protein required for both 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid biosynthesis and biofilm formation. Mol. Microbiol. 2006; 61:861–70.
48. Vuong C., Kocianova S., Voyich J. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J. Biol. Chem. 2004; 279:54881–6.
49. Wang Y., Ding L., Hu Y. et al. The fhDC gene affects motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis*. Sci. China. 2007; 50(6):814–21.
50. Wortham B., Oliveira M., Fetherston J. et al. Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for *Yersinia pestis* biofilm formation. Environ. Microbiol. 2010; 12(7):2034–47.

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

1. Bibikova V.A., Klassovsky L.N. [Plague Transmission by Fleas]. M.: Meditsina; 1974. 187 p.
2. Vashchenok V.S. [Fleas – vectors of infectious agents, which cause human and animal diseases]. L.: Nauka; 1988. 163 p.
3. Velichko L.N., Kondrashkina K.I., Ermilov A.P. et al. [Flea excrements are the natural habitat for *Y. pestis* long-lasting preservation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1978; 64:51–4.
4. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N. Yu., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Biofilm formation in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* on the model of *Caenorhabditis elegans*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 1(99):31–4.
5. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N. Yu., Konnov N.P., Kuznetsov O.S., Odinokov G.N., Kutyrev V.V. [Study of the ability to form biofilms in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 5:13–9.
6. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Study of the process of biofilm formation in *Yersinia pestis* strains isolated in 2009 in the territory of the Astrakhan region]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 3:3–7.
7. Kutyrev V.V., Protsenko O.A. [Classification and molecular genetic studies of *Yersinia pestis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1998; 78:11–7.
8. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular basis for interaction between plague agent and invertebrate animals]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2009; 4:6–13.
9. Nikul'shin S.V., Onatskaya T.G., Lukaniina L.M. et al. [Studies of associations between soil *Hartmannella rhyssodes* amoeba and pathogenic bacteria – *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, by way of experiment]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1992; 9–10:2–5.

Authors:

Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru