

Л. В. Диденко¹, О. В. Садретдинова¹, Н. В. Шевлягина¹, Г. А. Автандилов¹, И. В. Новокионова²,
Т. И. Карпова¹, О. А. Груздева³, И. С. Тартаковский¹

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОПЛЕНОК В ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМАХ

¹ФГБУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18; ²ФГУЗ
Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 117105, Москва, Варшавское ш., 19а;
³ГОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 119991,
Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Изучены особенности структурной организации биопленок, образуемых с участием легионелл, в системах водоснабжения лечебно-профилактических учреждений и градирнях промышленных предприятий в Московском регионе, для выработки новых подходов к профилактике легионеллеза в потенциально опасных водных системах. Показано, что на защитных антибактериальных фильтрах, монтированных в системе горячего водоснабжения отделения групп риска ЛПУ в течение 2–3 нед, здесь формируется массивная биопленка легионелл в ассоциации с другими грамположительными и грамотрицательными бактериями. Изучены особенности структурной организации биопленок легионелл на поверхности градирен, представляющих совокупность нескольких систематических групп микроорганизмов – грибов, бактерий (грамположительных и грамотрицательных) и сине-зеленых водорослей, располагавшихся на фоне матрикса и включений металлов. Результаты подтверждают необходимость разрушения и предотвращения формирования природных биопленок легионелл в потенциально опасных водных системах в качестве необходимого компонента современной стратегии профилактики легионеллеза.

Ключевые слова: легионеллы, биопленки, водоснабжение, профилактика

L. V. Didenko¹, O. V. Sadretdinova¹, N. V. Shevlyagina¹, G. A. Avtandilov¹, I. V. Novokhonova², T. I. Karpova¹, O. A. Gruzdeva³, I. S. Tartakovskiy¹

MORPHOLOGICAL FEATURES OF BIOFILMS IN POTENTIALLY DANGEROUS WATER SYSTEMS

IN.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health and Social Development of Russia, 18 Gamaleya St., Moscow 123098; 2Federal Center for Hygiene and Epidemiology, 19a Varshavskoye Sh., Moscow 117105; 3I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

The specific features of the structural organization of biofilms formed with the participation of Legionella in the water supply systems of health care facilities (HCF) and in the water-cooling towers of industrial enterprises in the Moscow Region were studied to elaborate new approaches to preventing legionellosis in the potentially dangerous water systems. A massive Legionella biofilm in association with other gram-positive and gram-negative bacteria was shown to form for 2-3 weeks on the protective antibacterial filters built in the hot water supply systems of the risk-group units of HCFs. The specific features of the structural organization of biofilms of Legionella onto surface of water-cooling towers, which were a set of a few systematic groups of microorganisms, such as fungi, gram-positive and gram-negative bacteria, and cyanobacteriae located in the presence of a matrix and metal inclusions. The results confirm that it is necessary to destruct and prevent the formation of natural Legionella biofilms in the potentially dangerous water systems, which is an essential component of the current strategy for the prevention of legionellosis.

Key words: Legionella, biofilms, water supply, prevention

Формирование природных биопленок с участием легионелл на оборудовании систем водоснабжения является потенциально опасным фактором в распространении легионеллеза. Наиболее часто эпидемические вспышки легионеллеза за рубежом связаны с контаминацией градирен (водных систем охлаждения) или систем горячего водоснабжения промышленных предприятий, гостиниц, ЛПУ. Так, по данным Европейской рабочей группы по легионеллезу (EWGLI), с 2002 по 2007 г. в европейских странах зарегистрированы 44 эпидемические вспышки, связанные с контаминацией градирен и 215 эпидемических вспышек и групповых случаев легионеллеза, связанных с контаминацией систем водоснабжения [5, 12, 17, 19]. Данные объекты являются предме-

том регулярного профилактического мониторинга. За последние годы в Российской Федерации была разработана современная методическая база для выявления легионелл в окружающей среде и внедрены эффективные методы эпидемиологического надзора за легионеллезной инфекцией [4, 7, 10]. Во время крупнейшей в мире за 2007 г. эпидемической вспышки легионеллеза в Верхней Пышме, Свердловская область, была выявлена массивная контаминация легионеллами централизованной системы горячего водоснабжения в результате длительного застоя воды в период ремонтных работ на СУГРЭС [8]. Исследования, проводившиеся в Московском регионе, показали высокую степень контаминации легионеллами градирен промышленных предприятий и систем горячего водоснабжения зданий общественного пользования, в том числе и ЛПУ [6, 11].

Важнейшим фактором распространения легионелл в различных водных объектах является их спо-

Для корреспонденции: Диденко Любовь Васильевна, д-р мед. наук, зав. лаб. анатомии микроорганизмов НИИЭМ, e-mail: lyubov.didenko@mail.ru

способность к существованию и размножению в составе биопленок. Образование биопленок на поверхности оборудования систем водоснабжения, других инженерно-технических сооружений, связанных с циркуляцией воды, является ключевым фактором накопления потенциально опасных концентраций легионелл. Биопленки широко представлены в искусственных водных системах. Они формируются на внутренних поверхностях труб систем водоснабжения, фильтрации и очистки воды, в системах водного охлаждения производственного цикла или систем кондиционирования воздуха и т.д. Биопленка представляет собой особое структурное образование сообщества микроорганизмов, обеспечивающее их выживание и поддержание численности, так как формирующийся полисахаридный слой в совокупности с другими продуктами жизнедеятельности микроорганизмов образует матрикс биопленки, обеспечивающий бактериям защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды [9, 12, 14].

Предполагается, что при образовании биопленок у многих бактерий происходит переключение систем метаболизма от свободноживущего к организованному, “общественному” образу жизни, более характерному для многоклеточных организмов, при этом наблюдается обмен химическими сигналами между микроорганизмами в пределах одного вида и между видами. В составе биопленок бактерии хорошо защищены от неблагоприятных влияний, химических и биологических факторов окружающей среды. Так, известно, что обычные способы дезинфекции воды в системах водоснабжения жилых домов, больниц и т.д. с помощью свободного хлора практически неэффективны против легионелл, находящихся в составе биопленок. Серьезной проблемой является формирование биопленок, в том числе состоящих из легионелл, в резиновых и пластмассовых дренажных трубках, катетерах, других изделиях, применяемых в хирургии, а также в системах водоснабжения и водотводов стоматологических установок. Среди компонентов естественных биопленок, помимо легионелл были идентифицированы и другие микроорганизмы, прежде всего *P. aeruginosa* [18, 20].

При изучении биопленок, образованных патогенными микроорганизмами, особое место принадлежит методам электронной микроскопии. Методы микроскопии получают все более широкое применение для выявления биопленок в природных объектах и организме человека. Данные микроскопических методов позволяют изучить структурные особенности биопленок, динамику их образования и оценить влияние различных факторов внешнего воздействия [2]. Анализ особенностей формирования биопленок легионелл на поверхности различного оборудования необходим для создания препаратов, разрушающих биопленки или предотвращающих их образование.

Цель данного исследования состояла в изучении особенностей структурной организации биопленок, образуемых с участием легионелл, в системах водоснабжения лечебно-профилактических учреждений и градирнях промышленных предприятий в Москов-

ском регионе для выработки новых подходов к профилактике легионеллеза в потенциально опасных водных системах.

Материалы и методы

В работе исследовали образцы биопленок из градирен промышленных предприятий Московской области и систем горячего водоснабжения ЛПУ Москвы.

При визуальном обнаружении биопленки на поверхности чаши градирни для исследования брали не менее двух проб из различных участков поверхности с помощью стерильного скальпеля или шпателя размером 5 × 5 см.

Для исследования формирования биопленок *Legionella pneumophila* в системах горячего водоснабжения ЛПУ на водопроводные краны в отделениях групп риска монтировали антибактериальные фильтры Pall (“Аквасейф”). После экспозиции в течение 1, 2 и 3 нед соответственно фильтры демонтировали и исследовали биопленку, сформировавшуюся на внешней поверхности фильтра.

Количественное определение *Legionella pneumophila* в биопленках из градирен и систем горячего водоснабжения осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2217-07 “Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды” [1, 3, 4] с помощью бактериологического метода на среде ВСУЕ и набора для латекс-агглютинации (“Oxoid”, Великобритания).

Для изучения биопленок методами сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии полученные образцы были фиксированы по методу Ito-Kanjorski [13].

Для анализа ультратонких срезов биопленки препараты были подготовлены по общепринятой методике заливки в заливочную среду L. White [15]. Ультратонкие срезы получали с помощью ультрамикротомы LKB-3, окрашивали по методу Reynolds [16] и изучали в электронном микроскопе JEOL 100 В (Япония).

Образцы также были изучены в сканирующем двулучевом электронном микроскопе Quanta 200 3D (“FEI Company”, США). Пробоподготовка образцов для этого метода исследования заключалась в упомянутой выше фиксации и напылении нанослоем золота толщиной 5 нм, что позволяло сохранить нативную структуру образца.

Результаты и обсуждение

Ранее с помощью бактериологических исследований и ПЦР в реальном времени нами был выявлен высокий уровень контаминации легионеллами градирен промышленных предприятий и систем горячего водоснабжения в зданиях общественного пользования (ЛПУ, гостиницы, бизнес- и торговые центры) в Московском регионе [6, 11]. Высокий уровень контаминации легионеллами, в том числе системная колонизация объектов, сопровождался формированием хорошо видимых невооруженным глазом биопленок. Наряду с легионеллами в об-

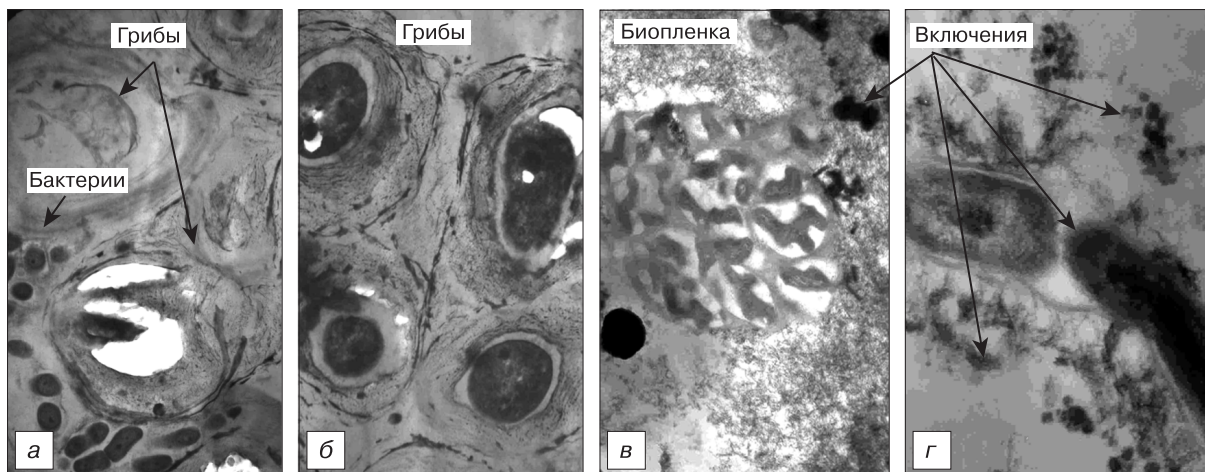


Рис. 1. Вариант биопленок градири: а – биопленка с ассоциацией бактерий и грибов; б – биопленка – грибы; в, г – биопленка с неорганическими включениями. Ув. 15 000.

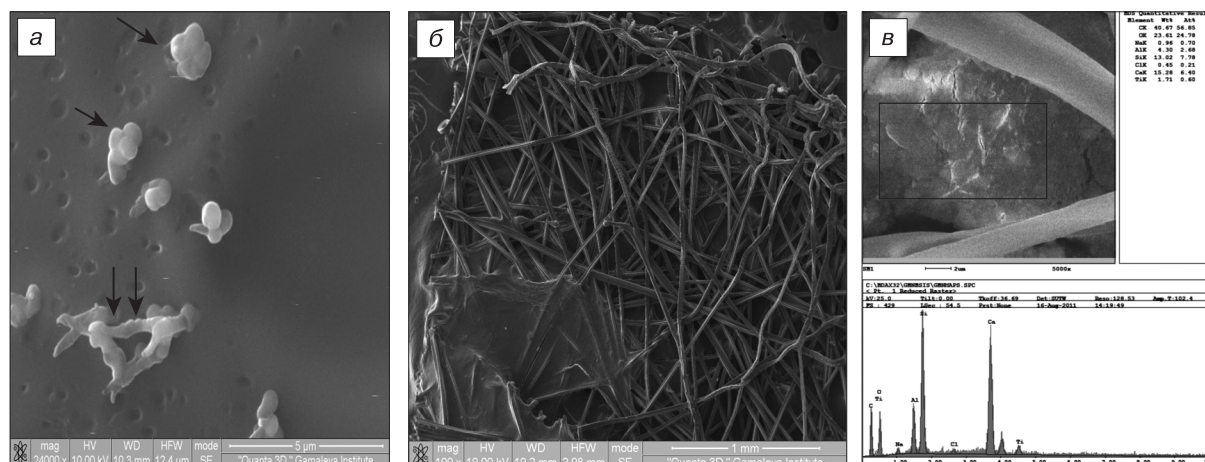


Рис. 2. Этапы формирования биопленки при использовании фильтров Pall на санитарно-техническом оборудовании: а – адгезия и формирование колоний на фильтре Pall в 1-е сутки – кокки ↑, палочки ↑↑ на фильтре в системе водоснабжения ЛПУ; б – образование биопленки на фильтре Pall на 7-е сутки в системе водоснабжения ЛПУ; в – рентгеновский микроструктурный анализ биопленки градири.

разцах выявлялся широкий спектр микроорганизмов, в том числе возбудителей внутрибольничных инфекций (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Brevibacterium vesicularis*, *Micrococcus luteus*).

При исследовании ультратонких срезов образцов биопленок было показано, что биопленка представляла собой совокупность нескольких систематических групп микроорганизмов – грибов, бактерий (грамположительных и грамотрицательных) и сине-зеленых водорослей, располагавшихся на фоне матрикса и включений металлической электронной плотности (рис. 1, а, б, в, г).

Грамотрицательные бактерии, идентичные по ультраструктурной организации легионеллам, были окружены экзоклеточным матриксом и при этом тесно контактировали с клеточными стенками грибов и сине-зеленых водорослей (см. рис. 1, а, б). Были обнаружены особые структурные образования, плотный матрикс которых формировал округлые структуры в виде “пчелиных сот”, внутри которых находились бактерии с электронно-плотным матриксом и плохо структурированными поверх-

ностными структурными компонентами – клеточной стенкой, цитоплазматической мембраной (см. рис. 1, в). Подобного рода субмикроскопическая организация характерна для некультивируемых форм бактерий [2].

В цитоплазме некоторых бактерий можно было видеть мелкозернистые включения металлической электронной плотности. Такие включения не выявляются в клетках культур бактерий, выращенных в искусственных лабораторных условиях. Микроэлементный анализ биопленок показал наличие в их составе углерода, кислорода, азота, серы, а также включений разных металлов, например титана, железа, натрия, магния и др. (рис. 2, в). Обнаружение в биопленке металлической плотности частичек может свидетельствовать о вовлечении в метаболические процессы металлов, из которых состоит поверхность оборудования, на котором образуется биопленка, т. е. указывать на биокоррозионные процессы.

Таким образом, природные биопленки представляют собой совокупность микроорганизмов, относящихся к представителям разных систематических

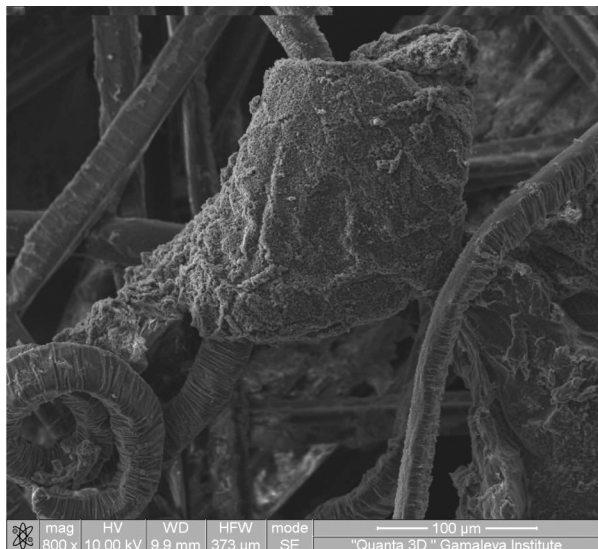


Рис. 3. Биопленка на фильтре Pall в системе водоснабжения ЛПУ (14 сут).

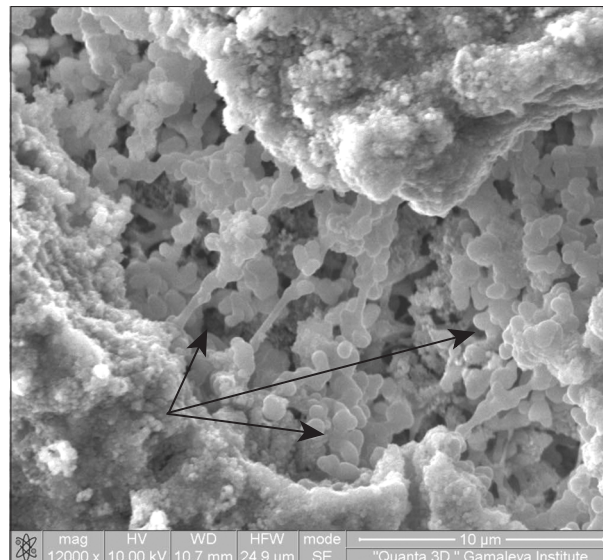


Рис. 4. Растрескивание биопленки (система водоснабжения ЛПУ, 21 сут) – видны бактерии внутри биопленки ↑.

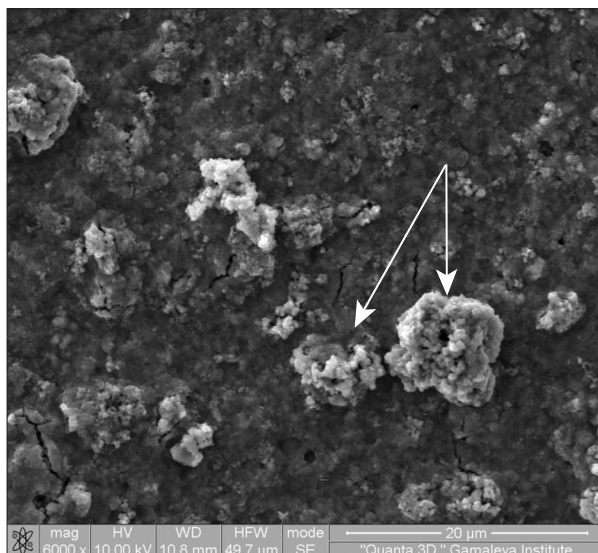
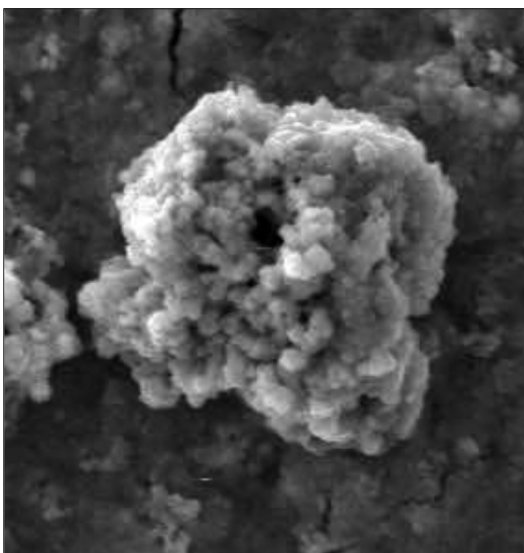


Рис. 5. Биопленка в фильтре Pall (14 сут), образованы номады на поверхности (система водоснабжения ЛПУ).



групп. Совместное сосуществование разных микроорганизмов в одной экологической нише обеспечивается трофическими цепями – продукты метаболизма одних сочленов сообщества служат питательным субстратом для других. Эффективная защита от неблагоприятных факторов внешней среды в таком организованном сообществе достигается интегральным синтезом экзополисахаридного матрикса. Помимо обнаруживаемых бактериологическими методами патогенных для человека бактерий в составе природных биопленок, грибы и сине-зеленые водоросли следует рассматривать как возможных возбудителей.

Анализ данных, полученных методом сканирующей электронной микроскопии при исследовании поверхности фильтров и собственно биопленок, извлеченных с поверхности градирен и водопроводных труб, подтвердил данные ультра-

структурного анализа. Было показано, что циркулирующие в водопроводной воде микроорганизмы адгезируют на твердой поверхности труб или фильтров, образуют микроколонии, синтезируют экзоклеточный матрикс и объединяются в организованные смешанные биопленки (см. рис. 1, а, б). Скорость образования биопленок на фильтрах достаточно высока – через 1 сут и через неделю на поверхности фильтров можно было видеть отдельные микроколонии (см. рис. 2, а, б; рис. 3), а через 2–3 нед – организованные смешанные биопленки с хорошо видимыми отдельными бактериями при растрескивании экзополисахаридного матрикса внутри биопленок и при формировании номад (см. рис. 3; рис. 4, 5). Номады – совокупность бактерий, способных покинуть резидентную биопленку и колонизировать новые поверхности. Номады могут рассматриваться как потенциально инфици-

рующее организм человека сообщество микроорганизмов, способных находиться в водных аэрозолях.

Полученные результаты дают представление о формировании и структуре биопленок, содержащих легионеллы, в потенциально опасных водных системах. Высокая скорость формирования биопленок на поверхности защитных фильтров Pall в системе водоснабжения ЛПУ свидетельствует о высоком уровне контаминации горячей воды в ЛПУ микроорганизмами. В диапазоне температуры воды 45–52°C на поверхности фильтра, установленного на водопроводном кране в течение 3 нед наблюдали активное формирование биопленок. Формирование биопленок в системах городского горячего водоснабжения общественных зданий скорее гигиеническая, чем эпидемиологическая проблема. В целом этот процесс не представляет опасности для здорового населения, поскольку в данном случае нет условий для возникновения мелкодисперсного аэрозоля, а возможна лишь аспирация воды, содержащей легионеллы и другие бактерии, входящие в состав биопленки в низкой концентрации. В отделениях групп риска ЛПУ ситуация принципиально меняется. Ассоциации микроорганизмов в биопленке могут быть причиной нозокомиальной инфекции в результате аспирации воды пациентами групп риска на фоне иммуносупрессии или сопутствующих заболеваний. Поэтому комплекс профилактических мероприятий по микробиологическому контролю и обеспечению безопасности водных систем в отделениях групп риска ЛПУ является необходимым компонентом современной концепции профилактики внутрибольничных инфекций.

Биопленки на поверхности градилен промышленных предприятий формируются в условиях непрерывного производственного процесса, являясь своеобразными “накопителями” легионелл, других микроорганизмов и химических соединений. В данной работе впервые биопленки градилен изучены комплексно с помощью электронно-микроскопических методов исследования (сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии). Результаты подтверждают представления о природных биопленках как устойчивых сообществах легионелл, грибов и водорослей. Впервые показано с помощью микроэлементного анализа наличие в биопленках включений различных металлов, в том числе титана и железа, что указывает на тесную взаимосвязь формирования биопленок с процессами коррозии. В данном случае нарушение равновесия между биопленочными и планктонными формами легионелл может привести к выбросу мелкодисперсного аэрозоля легионелл в атмосферу. Наличие в градириях промышленных предприятий больших количеств циркулирующей теплой воды в сочетании с образованием водного аэрозоля, способного распространяться в радиусе до нескольких километров, позволяет отнести данные объекты к числу опасных в от-

ношении возникновения эпидемических вспышек легионеллезной инфекции. Для предотвращения превышения концентрации планктонных форм легионелл в воде градири предельно допустимой концентрации (10^4 КОЕ/л) необходимо использовать дезинфектанты, эффективные против планктонных форм легионелл и биопленок. Причем, элиминация природных биопленок, содержащих легионеллы, является необходимым условием успешной дезинфекции потенциально опасных водных объектов.

Выводы

1. С помощью методов электронной микроскопии изучены морфологические особенности формирования природных биопленок легионелл в потенциально опасных водных системах: системе горячего водоснабжения ЛПУ и градири промышленного предприятия в Москве.

2. Показано, что на защитных антибактериальных фильтрах, монтированных в системе горячего водоснабжения отделения групп риска ЛПУ, в течение 2–3 нед формируется массивная биопленка легионелл в ассоциации с другими грамположительными и грамотрицательными бактериями.

3. Природные биопленки легионелл на поверхности градилен представляют собой совокупность нескольких систематических групп микроорганизмов – грибов, бактерий (грамположительных и грамотрицательных) и сине-зеленых водорослей, располагающихся на фоне матрикса и включений металлов.

4. Полученные результаты подтверждают необходимость разрушения и предотвращения формирования природных биопленок легионелл с помощью дезинфекционных мероприятий, использования защитных антибактериальных фильтров в потенциально опасных водных системах в качестве необходимого компонента современной стратегии профилактики легионеллеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аляпкина Ю. С., Дронина Ю. Е., Карпова Т. И. и соавт. Применение ПЦР в реальном времени для выявления легионелл в объектах окружающей среды // Журн. микробиол. – 2009. – № 2. – С. 75–80.
2. Диденко Л. В., Константинова Н. Д., Романова Ю. М. и др. Ультраструктурная организация клеток *Salmonella typhimurium* при длительном голодании и переходе в некультивируемое состояние // Молекул. генетика. – 2000. – № 3. – С. 21–26.
3. Методические указания по выявлению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды. МУК 4.2.22-17-07. – М., 2007.
4. Методические указания «Эпидемиологический надзор за легионеллезной инфекцией». МУЗ.1.2.2412-08. – М., 2008.
5. Онищенко Г. Г., Демина Ю. В., Тартаковский И. С. Современная концепция организации эпидемиологического надзора за легионеллезной инфекцией // Журн. микробиол. – 2009. – № 5. – С. 85–91.
6. Садретдинова О. В., Груздева О. А., Карпова Т. И. и др. Контаминация *Legionella pneumophila* систем горячего водоснабжения зданий общественного назначения, в том числе лечебно-профилактических учреждений // Клини. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2011. – № 2. – С. 163–167.

7. Санитарные правила 3.1.2.2626-10 «Профилактика легионеллеза». – М., 2010.
8. *Тартаковский И. С., Гинцбург А. Л., Лазикова Г. Ф.* и др. Стандарты лабораторной диагностики легионеллеза и их применение во время эпидемической вспышки пневмоний в г. Верхняя Пышма // Журн. микробиол. – 2008. – № 2. – С. 16–19.
9. *Тартаковский И. С.* Мониторинг и контроль потенциально опасных водных объектов как основной путь профилактики легионеллеза // Вода: химия и экол. – 2009. – № 2. – С. 28–35.
10. *Тартаковский И. С., Демина Ю. В.* Методология и стандарты профилактики легионеллеза // Жизнь без опасностей. – 2010. – № 4. – С. 108–120.
11. *Тартаковский И. С., Новокионова И. В., Садретдинова О. В.* и др. Изучение частоты и уровня контаминации *Legionella pneumophila* потенциально опасных водных объектов в московском регионе // Журн. микробиол. – 2010. – № 6. – С. 21–25.
12. *Темежникова Н. Д., Тартаковский И. С.* Легионеллезная инфекция. – М., 2007.
13. *Ito S., Karnovsky M. J.* Formaldehyde/glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds // J. Cell Biol. – 1968. – Vol. 39. – P. 168a–169a.
14. *Legionella and the Prevention of Legionellosis.* – Geneva, WHO, 2007.
15. *Newman G. R., Jasani B., Williams E. D.* The preservation of ultrastructure and antigenicity // J. Microscopy. – 1982. – Vol. 127. – P. RP5–RP6.
16. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. – 1963. – Vol. 17, N 1. – P. 208–212.
17. *Ricketts K. D., Joseph C., Lee J., Wewalka G.* Survey on legislation regarding wet cooling systems European countries // Eurosurveillance. – 2008. – Vol. 13. – P. 373–377.
18. *Rogues A., Boulestreau H.* et al. Contribution of tap water to patient colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit // J. Hosp. Infect. – 2007. – Vol. 67. – P. 72–78.
19. *Sabria M., Pedro-Botet M., Gomez J.* et al. Environmental cultures and hospital-acquired Legionnaires' disease: a 5-year prospective study in 20 hospitals in Catalonia, Spain // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. – 2004. – Vol. 25, N 12. – P. 1072–1076.
20. *Van der Kooij D., Veenendal H.R., Scheffer W.* Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene // Water Res. – 2005. – Vol. 39, N 13. – P. 2789–2798.

Поступила 11.11.11

Сведения об авторах:

Садретдинова Оксана Владимировна, аспирант; **Шевлягина Наталья Владимировна**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. анатомии микроорганизмов; **Австандилов Георгий Александрович**, аспирант лаб. анатомии микроорганизмов; **Новокионова Ирина Владимировна**, зав. бактериологической лаб. Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, e-mail: baclab@fcgsen.ru; **Карпова Татьяна Игоревна**, ст. науч. сотр., канд. биол. наук ФГБУ НИИЭМ; **Груздева Ольга Александровна**, канд. мед. наук, доц. каф. эпидемиологии 1 МГМУ; **Тартаковский Игорь Семенович**, д-р биол. наук, проф., зав. лаб.