

fragments derived by reduction of disulfide bonds. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 6: 635-647.

38. Van Baar B.L.M., Hulst A.G., Wils E.R.J. Characterisation of cholera toxin by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Toxicon.* 1999, 1: 85-108.
39. Van Baar B.L.M., Hulst A.G., Roberts B. et al. Characterization of tetanus toxin, neat and in culture supernatant, by electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry.* 2002, 2: 278-289.

Поступила 05.07.17

Контактная информация: Чемисова Ольга Сергеевна, к.б.н.,  
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863) 240-35-94

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.В.Шубникова, Л.К.Мерينو́ва, Т.В.Сени́на, Е.В.Коро́ль, О.А.Мерино́ва*

## **БИОПЛЕНКИ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ И ИХ РОЛЬ В РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Обзор содержит данные литературы, касающиеся основных вопросов образования биопленок возбудителями мелиоидоза и сапа (*Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*). Рассмотрена роль известных структурных элементов клеток буркхольдерий (жгутиков, пилей IV типа, ЛПС), а также белков-автопереносчиков адгезинов в прикреплении бактерий к поверхностям, формировании микроколоний и образовании биопленки. Представлены материалы исследования генетических регуляторных механизмов (QS-систем, RpoE-сигма фактора, c-di-GMP, двухкомпонентной системы трансдукции сигналов TCS) и данные о дифференциально экспрессирующихся генах, имеющих отношение к формированию биопленки *B. pseudomallei*. Приведены результаты изучения роли биопленок в вирулентности и резистентности к антибиотикам патогенных буркхольдерий и их значения в развитии хронических форм и рецидивирующего течения мелиоидоза и сапа.

*Журн. микробиол.*, 2018, № 1, С. 101–111

Ключевые слова: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, биопленки, резистентность к антибиотикам

*Е.В.Шубникова, Л.К.Мерино́ва, Т.В.Сени́на, Е.В.Коро́ль, О.А.Мерино́ва*

## **BIOFILMS OF PATHOGENIC BURKHOLDERIA AND THEIR ROLE IN RESISTANCE TO ANTIBIOTICS**

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review contains the current knowledge on the main issues of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* biofilm formation. The role of known structural elements of *Burkholderia* cells (flagella, type IV pili, LPS), as well as autotransporter adhesin proteins in the attachment of bacteria to surfaces, the formation of microcolonies and biofilm is described. The review also includes information of genetic regulatory mechanisms (QS-systems, RpoE-sigma factor, c-di-GMP, two-component signal transduction system), differentially expressed genes related to the formation of *B. pseudomallei* biofilm, role of biofilms in the virulence and resistance to antibiotics of pathogenic *Burkholderia* and their significance for the chronic processes and recurrent course of melioidosis and glanders.

*Zh. Mikrobiol. (Moscow)*, 2018, No. 1, P. 101–111

Key words: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, biofilms, resistance to antibiotics

Патогенные буркхольдерии (*Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*), возбудители мелиоидоза и сапа, тяжелых инфекционных заболеваний человека и животных. Между этими видами буркхольдерий существует высокая степень генетического родства, тем не менее, они отличаются по ряду биологических свойств, определяющих, главным образом, их адаптационный потенциал и экологическую пластичность [23]. Известно, что *B. pseudomallei*, сапрофитный микроорганизм, патоген с широким кругом хозяев, естественной средой обитания которого являются почва и вода эндемичных регионов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии, Западной и Центральной Африки [8]. Принципиальное отличие возбудителя сапа от *B. pseudomallei* заключается в его облигатной паразитической природе, сформировавшейся в процессе адаптации к организму млекопитающих [23, 30].

Лечение мелиоидоза и сапа, особенно в острой форме, сопряжено со значительными трудностями, связанными, с одной стороны, с высокой природной резистентностью возбудителей к антибактериальным препаратам, с другой — со способностью их к внутриклеточному персистированию в макроорганизме [18, 35].

В свете современных представлений о биологии микроорганизмов стало очевидным, что большинство бактерий в окружающей среде и организме человека существует преимущественно не в планктонном (свободном) состоянии, а образует сообщества (био пленки).

Биопленка представляет собой высокоорганизованное сообщество, образованное клетками одного или нескольких видов бактерий, адгезированных к поверхности (абиотической или биотической) и друг к другу, заключенных в экзополимерный матрикс и имеющих фенотип, отличный от планктонных клеток, позволяющий им адаптироваться и выживать как во внешней среде, так и в макроорганизме [3, 11]. В первую очередь, биопленочная форма существования обеспечивает бактериям защиту от неблагоприятных воздействий, таких как антибактериальные средства, дезинфицирующие вещества и факторы иммунной системы. Считается, что образование биопленок имеет отношение к патогенезу более чем 80% инфекционно-воспалительных заболеваний. Формирование бактериальных сообществ в очаге воспаления может приводить к хронизации инфекционного процесса, развитию осложнений и сопровождается неудовлетворительным результатом антибиотикотерапии [3, 10].

В ряде исследований *in vitro* и *in vivo* показана способность возбудителей мелиоидоза и сапа к образованию микроколоний и биопленок. Предполагают, что образование биопленок не играет существенной роли для вирулентности *B. pseudomallei*, но связано с развитием рецидивов и устойчивости к антибактериальным препаратам [40].

Известно, что процесс формирования биопленки состоит из нескольких последовательных стадий с общими особенностями, независимо от вида микроорганизма: стадия первичного прикрепления планктонных клеток к субстрату из окружающей среды и образование монослоя (обратимая адгезия); стадия необратимого связывания с поверхностью и начало формирования микроколоний (фиксация); стадия интенсивной пролиферации и синтеза экстрацеллюлярного полимерного матрикса (созревание); стадия дифференциации микроколоний в зрелые биопленки (рост); стадия распространения или дисперсии (открепление от поверхности зрелой биопленки отдельных клеток, их перенос и прикрепление в отдаленных тканях макроорганизма с образованием новых колоний) [14, 22].

Адгезия грамотрицательных бактерий к абиогенным и биогенным поверхностям — ключевой этап в биопленочном процессе, обусловленный неспецифическими физико-химическими взаимодействиями клеток с поверхностью (электростатическими, гидрофобными, силами Ван-дер-Ваальса) и специфическими контактами белков-адгезинов с рецепторами эукариотических клеток [14].

Важными элементами в процессе специфической адгезии и колонизации субстратов планктонными бактериями *V. pseudomallei* являются жгутики, фимбрии (пили IV типа), белки-автотранспортеры (BoaA, BoaB) и липополисахариды (ЛПС).

Жгутиковая подвижность способствует первичному прикреплению бактерий, образованию и распространению клеточного монослоя, облегчая перемещение буркхольдерий к поверхностям. Было показано, что мутант *V. pseudomallei* (MM35) по структурному гену флагеллина *fliC*, утративший жгутиковую подвижность, характеризуется более низким уровнем образования биопленки, чем штамм дикого типа [12, 41].

Фимбрии (пили) также могут принимать участие как в непосредственной адгезии *V. pseudomallei* к субстратам (например, к клеткам макроорганизма), так и в межклеточных контактах при формировании возбудителем мелиоидоза микроколоний и биопленок. Было продемонстрировано, что мутации в генах, кодирующих пили IV типа, влияют на способность *V. pseudomallei* прикрепляться к эукариотическим клеткам и проявлять вирулентность в отношении нематод и мышей. У мутанта *V. pseudomallei*, не формирующего пили, одновременно наблюдается снижение как адгезивных, так и вирулентных свойств [17].

При исследовании штаммов *V. pseudomallei* UM1 и UM6, отличающихся по способности к образованию биопленок, у штамма UM6 с высокой биопленкообразующей способностью была обнаружена гиперэкспрессия генов, ответственных за образование фимбрий, включая три шаперонных кластера генов (BPSL1799 — BPSL1801; BPSL2026 — BPSL2028; BPSS0091 — BPSS0093), формирующих шаперонный путь фимбриеобразования (CUP), что предполагает их участие в адгезии возбудителя к абиотическим поверхностям. При этом штамм UM1 со сниженной способностью к образованию биопленки формировал мукоидный морфотип колоний и характеризовался низким уровнем экспрессии пилей, фимбрий, липопротеинов, полисахаридов и EPS-связанных генов по сравнению с UM6, образующим колонии шероховатого типа [9].

На ранних стадиях образования буркхольдериями биопленок значительную роль играют также тримерные белки-автотранспортеры адгезинов (ТАА). Lazar Adler N.R. et al. сообщают, что геном *V. pseudomallei* K96243 содержит гены девяти ТАА, среди которых охарактеризованы только два белка — BoaA и BoaB, участвующих в адгезии возбудителя к эукариотическим клеткам. Показано, что мутации в генах *boaA* и *boaB* приводят к снижению адгезивных свойств *V. pseudomallei* к эукариотическим клеткам хозяина, в то время как экспрессия рекомбинантных белков BoaA и BoaB в *Escherichia coli* повышает адгезивные свойства микроорганизма [27].

Экспериментально установлено непосредственное влияние тримерных белков-автотранспортеров адгезинов на образование биопленок возбудителем мелиоидоза. Инсерционный мутант, дефектный по гену *bpss1439* (гипотетического ТАА), демонстрировал сниженную биопленкообразующую способ-

ность и вирулентность для мышей по сравнению с диким типом *B. pseudomallei* 10276. Кроме того, мутант *B. pseudomallei* обладал низкой способностью к адгезии и формированию микроколоний на абиотических поверхностях [4, 26].

Липополисахариды — основные компоненты наружной мембраны бактериальных клеток, придающие им гидрофильность, играют важную роль в первоначальном прикреплении клеток к субстратам и в развитии зрелой биопленки за счет взаимодействий клеток с другими клетками и с компонентами матрикса.

В исследованиях Yuen C.W. et al. показано, что мутантные штаммы *B. pseudomallei* с нарушенным биогенезом капсулы и липополисахарида характеризуются различной способностью к образованию биопленок. Интересно, что бескапсульный мутант *B. pseudomallei* wcbB (ген гликозилтрансферазы, участвующий в синтезе капсульного полисахарида) демонстрировал уровень формирования биопленки аналогичный дикому штамму. Наряду с этим, бескапсульный мутант *B. pseudomallei* wzm (ген белка ABC транспортера капсульного полисахарида) характеризовался сниженной биопленкообразующей способностью, повышенной чувствительностью к окислительному стрессу и высушиванию при выращивании на минимальной питательной среде, но не в LB бульоне. Сканирующая электронная микроскопия мутантных бактериальных клеток выявила дефекты в структуре мембран. Вероятно, транспортный мембранный белок участвует в процессе биопленкообразования при определенных условиях среды [47].

После адгезии клетки *B. pseudomallei* прекращают активно передвигаться и начинают интенсивно размножаться с образованием монослоя. Формируются многоклеточные скопления (микроколонии), которые синтезируют внеклеточный биополимерный матрикс.

В ряде исследований методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии установлено, что в процессе колонизации биотических и абиотических поверхностей *B. pseudomallei* продуцирует высокогидратированный гликокаликс [21, 46]. С помощью хромато-массспектрометрического анализа (ГХ-МС) экзополисахарида *B. pseudomallei* Mongkolroob R. et al. показали, что в его состав входят молекулы глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы в соотношении 1.00:1.31:0.82:0.30 [32].

Микроколонии дифференцируются в зрелые биопленки, приобретая характерную форму. На периферии биопленки находятся быстрорастущие клетки, внутри биопленки, где создаются анаэробные условия, клетки растут медленнее. Ввиду того, что плотность бактериальной популяции быстро увеличивается, к регуляции биопленочного процесса подключаются коммуникативные системы и формируется резистентный фенотип.

Установлено, что образование и развитие биопленок — динамический многостадийный процесс со сложной системой регуляции, основанной на межклеточной коммуникации. Наиболее изученными являются системы quorum sensing (QS), обнаруженные у большинства грамотрицательных патогенных и фитопатогенных бактерий, принадлежащих к родам *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia*. QS-системы регуляции экспрессии генов функционируют с участием молекул аутоиндукторов из семейства ацилгомосеринлактонов (AHL); синтез аутоиндукторов происходит в ответ на изменение плотности популяции [1].

В настоящее время показано, что у патогенных буркхольдерий генетически регулируемый процесс образования биопленок контролируется посредством коммуникативных систем [19].

Геном *V. pseudomallei* кодирует три регуляторные ацилгомосеринлактонные системы quorum sensing (AHL QS), гомологичные генетической системе *luxI-luxR* кворум — зависимой системы *BpsI1-BpsR1* (QS-1), *BpsI2-BpsR2* (QS-2) и *BpsI3-BpsR3* (QS-3) *Vibrio fischeri* [42, 43].

QS-1 или система *BpsI1-BpsR1*, где *BpsI1* (N-ацилгомосеринлактонсинтаза), продуктом которой является N-(октаноил)-лактон гомосерина ( $C_8$ HSL), а *BpsR1* — белок регулятор транскрипции;  $C_8$ HL, связываясь с *BpsR1*, активирует его, в результате чего изменяется экспрессия QS-зависимых генов-мишеней [19, 24].

Система QS-2 включает *BpsI2-BpsR2*, продуцирует N-(3)-гидроксидеканоил-лактон гомосерина (3ОН $C_{10}$ -HSL), и QS-3 состоит из *BpsI3-BpsR3* и N-(3)-гидроксиоктаноил-лактон гомосерина (3ОН $C_8$ -HSL). Возбудители сапа и мелиоидоза используют гомологичные системы AHL QS. Однако в процессе адаптивной эволюции *V. mallei* потерял большую геномную область, содержащую гены QS-2 и поэтому содержит только системы QS-1 и QS-3 (*BmaI1-BmaR1* и *BmaI3-BmaR3*) [15, 16, 31].

Экспериментально показано, что QS-1 *V. pseudomallei* KHW необходима для образования биопленок. Мутанты *V. pseudomallei* с выключенными *BpsI1-BpsR1* не могут синтезировать  $C_8$ HSL и характеризуются сниженной способностью к образованию биопленок, которая может быть восстановлена до уровня дикого типа внесением экзогенного лактона  $C_8$ HSL [19]. Наряду с этим установлено, что внеклеточная секреция AHLs у *V. pseudomallei* зависит от эффлюкс-системы *BpeAB-OrpB*, ответственной за множественную лекарственную устойчивость и ее обратного регулятора *BpeR* [7].

Отмечено, что индукция экспрессии генов *bpeAB-orpB* происходит в стационарной фазе роста культур, а также *in vitro* при добавлении в среду лактонов  $C_8$ HSL или  $C_{10}$ HSL. Изучение мутантов *V. pseudomallei* *bpeAB* или штаммов с гиперэкспрессией *bpeR* показало, что эффлюкс-система необходима для образования биопленок, синтеза сидерофоров и фосфолипазы C. Кроме того мутанты, лишённые этой системы, обладали пониженной инвазивностью и цитотоксичностью для эукариотических клеток легочного эпителия и макрофагов, а снижение инвазивности частично восполнялось добавлением AHL,  $C_8$ HSL [7].

У *V. pseudomallei* была выявлена еще одна QS-подобная система, имеющая отношение к продукции, высвобождению и распознаванию сигнальных молекул 4-гидрокси-3-метил-2-алкилхинолона (HMAQ). В геноме *V. pseudomallei* K96243 был идентифицирован оперон, названный *hmqABCDEFGHI* (BPSS0481—BPSS0487), гомологичный генам биосинтеза HMAQ у *Pseudomonas aeruginosa*, регулирующим экспрессию генов, ответственных за вирулентность, образование биопленок и, таким образом, играющих ключевую роль в развитии инфекции, вызываемой *P. aeruginosa*.

Мутант *V. pseudomallei* *hmqA* не синтезировал HMAQ и имел измененную морфологию колоний, повышенный уровень продукции эластазы, который снижался до уровня штамма дикого типа при добавлении экзогенного HMAQ. Роль хинолоновой кворум системы в формировании биопленок *V. pseudomallei* еще предстоит выяснить [13, 45].

Кроме того, установлено, что QS системы связаны с вирулентностью как

*V. pseudomallei*, так и *V. mallei*. Мутантные штаммы этих микроорганизмов с инактивированными генами *luxI* или *luxR* были аттенуированны по вирулентности на нескольких моделях инфекций и демонстрировали абберантную внутриклеточную репликацию [20, 31, 44]. Некоторые исследователи предполагают, что QS системы могут играть немаловажную роль в развитии сапа и мелиоидоза, а также в регуляции перехода инфекционного процесса от острого к хроническому течению. Не известно, какой QS-контролируемый фактор или группа факторов реализуются в макроорганизме, однако описание этих факторов позволяет прийти к более глубокому пониманию патогенеза сапа и мелиоидоза [31].

Другим регуляторным механизмом, который потенциально может играть роль в образовании буркхольдерияльных биопленок, является альтернативный сигма-фактор *RpoE* (субъединица РНК-полимеразы). Сигма-фактор (*RpoE*) *in vivo* является глобальным регуляторным фактором экспрессии генов при переходе клеток к стационарной фазе роста, в том числе, в условиях стресса. Инактивация оперона *groE* приводит к снижению способности *V. pseudomallei* образовывать биопленки, а также к понижению вирулентности и устойчивости к окислительному стрессу. Было показано, что у мутантных по генам *groE* штаммов *V. pseudomallei* на 50% снижается биопленкообразующая способность по сравнению с диким типом [18, 19, 25].

Существенная роль в регуляции процессов образования и отторжения биопленки у возбудителя мелиоидоза отводится циклическому дигуанозинмонофосфату (*c-di-GMP*). Уровень *c-di-GMP* регулируется двумя классами ферментов — дигуанилатциклазами, которые синтезируют *c-di-GMP*, а также фосфодиэстеразами, которые гидролизуют *c-di-GMP*, превращая его в неактивную форму дигуанозинмонофосфата, который, в свою очередь, выступает в качестве вторичного мессенджера и влияет на синтез внеклеточного матрикса и адгезию бактерий.

Известно, что низкий уровень *c-di-GMP* повышает способность бактерий к планктонному образу жизни, усиливает жгутиковую подвижность, продукцию факторов патогенности, а высокий, наоборот, способствует снижению подвижности, повышению продукции экзополисахаридов и агрегации клеток (биопленкообразанию) [34].

Показано, что мутант *V. pseudomallei* КНW *cdpA*, дефектный по гену *c-di-GMP*-фосфодиэстеразы (фермента регулирующего уровень циклического дигуанозинмонофосфата в клетке) с высоким уровнем синтеза *c-di-GMP*, характеризовался снижением подвижности, цитотоксичности и вирулентности, а также повышенной агрегацией, продукцией внеклеточного экзополисахарида и высоким уровнем биопленкообразования [28].

К коммуникативным системам также относят системы, реагирующие не только на плотность бактериальной популяции, но и на условия, сигнализирующие о стрессовых ситуациях, с которыми сталкиваются бактерии. Chin C.Y. et al. [9] при проведении глобального транскрипционного анализа генов, ответственных за формирование биопленочного фенотипа у штаммов *V. pseudomallei*, обнаружили 563 дифференциально экспрессирующихся гена, имеющих отношение к образованию биопленок, что составляет около 9,5 % всего генома возбудителя мелиоидоза. Основываясь на транскрипционных профилях штаммов с высоким уровнем формирования биопленок, авторы высказали предположение, что у *V. pseudomallei* в ответ на изменение условий среды (рН, температуры, осмотического давления и концентрации кислорода)

активируются различные двухкомпонентные системы передачи (трансдукции) сигнала (TCS).

В условиях стрессового воздействия на клеточные мембраны *B. pseudomallei*, вероятно, активируется система RcsB/RcsC TCS, которая регулирует транскрипцию генов, кодирующих белки, участвующие в изменении поверхностных структур клеток, а именно, капсульных полисахаридов, липопротеинов, биогенезе клеточной оболочки и синтезе фосфолипидов и жирных кислот, тем самым обеспечивая выживание *B. pseudomallei* в организме хозяина. Кроме того, у штамма *B. pseudomallei* с высокой биопленкообразующей способностью наблюдалось значительное усиление продукции двух гипотетических белков (BPSL0616 и BPSL0617), относящихся к суперсемейству CRP/FNR. Один из них (BPSL0617) предположительно ортологичен белку регулятору транскрипции Bcam1349, который путем связывания с c-di-GMP регулирует образование биопленки, индуцируя экспрессию генов, кодирующих ферменты для синтеза целлюлозы и фимбрий у *Burkholderia cenocepacia* в ответ на изменение уровня c-di-GMP [9].

Из перечисленных свойств биопленок клиническое значение имеют высокая устойчивость к антибактериальным препаратам, внешним воздействиям и факторам иммунной системы макроорганизма. Важным является тот факт, что в составе биопленок патогенные буркхольдерии приобретают высокую устойчивость к антибактериальным препаратам, применяемым для лечения сапа и мелиоидоза.

В настоящее время многими исследователями показано значительное повышение антибиотикорезистентности к цефтазидиму, имипенему, доксициклину, ко-тримоксазолу и амоксиклаву штаммов *B. pseudomallei*, интегрированных в биопленки, по сравнению с планктонными культурами [5, 6, 36].

Предполагают, что повышенная резистентность бактерий в биопленке может определяться рядом факторов: барьерной функцией матрикса, затрудняющего или замедляющего диффузию препаратов во внутренние слои биопленки; присутствием в биопленках метаболически неактивных клеток-персистеров, нечувствительных к антибактериальным средствам; более эффективной индукцией систем транспорта и ферментативного расщепления антибактериальных препаратов; селекцией штаммов бактерий с множественной антибиотикорезистентностью [2, 33].

В работе Pibalpakdee P. et al. показано, что биопленки *B. pseudomallei* являются барьером для диффузии имипенема и цефтазида. При сравнении скорости диффузии антибактериальных препаратов через биопленки штаммов с низкой и высокой интенсивностью биопленкообразования установлено замедление проникновения имипенема и цефтазида в биопленку штамма, характеризующегося высоким уровнем биопленкообразования. При этом авторами отмечена низкая эффективность антибактериальных препаратов в отношении биопленочных буркхольдерий обоих штаммов [33]. В исследованиях Castelo-Branco D.S. et al. обнаружено усиление действия антибактериальных препаратов, применяемых при лечении мелиоидоза, на зрелые биопленки *B. pseudomallei* при их сочетании с фарнезолом (сесквитерпеновым спиртом). Предполагается, что под воздействием фарнезола происходит дезорганизация матрикса биопленок, что, в свою очередь, облегчает проникновение антибактериальных препаратов в толщу биопленок [6].

Экспериментально установлено, что в биопленках грамотрицательных бактерий происходит более эффективная индукция (гиперэкспрессия) эф-

флюксных систем выведения и ферментативных систем расщепления антибактериальных препаратов по сравнению с планктонными бактериями [37, 39].

В этой связи, интересной является работа Sidrim J.J. et al. по изучению влияния на планктонные бактерии и биопленки *B. pseudomallei* антибактериальных препаратов в сочетании с ингибитором эффлюкс-систем — прометазинном. Исследователи провели сравнительную оценку чувствительности планктонных и биопленочных буркхольдерий к гентамицину, эритромицину, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу, являющихся субстратами для эффлюкс-систем, в сочетании с прометазинном и без него. Было установлено, что ингибитор эффлюкс-систем повышает эффективность антибактериальных препаратов в отношении как биопленок *B. pseudomallei*, так и планктонных бактерий. Кроме того, с помощью электронной микроскопии были продемонстрированы деструктивные изменения 48-часовых биопленок *B. pseudomallei* под воздействием прометазина (деформация, фрагментация, уменьшение биомассы) [38].

По мнению авторов, ингибиторы эффлюксных систем могут рассматриваться как потенциальные средства для преодоления биопленочной устойчивости. Однако механизмы их антибиопленочной активности еще предстоит изучить. Вероятно, под действием ингибиторов происходит накопление метаболитов в клетке, а также снижение транспорта компонентов кворум-систем, что приводит к нарушению динамического процесса биопленкообразования и, как следствие, к снижению резистентности бактериальной популяции. Наряду с этим, изменения в структуре биопленки могут способствовать лучшему проникновению антибактериальных препаратов.

Неоднородность условий среды, возникающих в разных слоях биопленки (разница в доступе кислорода, питательных веществ, pH), создает предпосылки для одновременного существования активно растущих клеток (периферия биопленки), клеток со сниженным уровнем метаболизма — персистеров, а также метаболически неактивных клеток (покоящихся и неделящихся), расположенных во внутренних слоях. В глубоких слоях биопленки бактерии, испытывая дефицит питательных веществ и кислорода (анаэробные условия), переходят в покоящееся или некультивируемое состояние, а медленно растущие или нерастущие клетки оказываются малочувствительными к воздействию антибактериальных средств. Показано, что *B. pseudomallei* при формировании биопленок в анаэробных условиях может утилизировать нитраты в качестве альтернативного акцептора электронов, используя путь денитрификации. Предполагают, что *B. pseudomallei* может реагировать на условия недостатка кислорода с помощью двухкомпонентной системы  $\text{NarX/NarL TCS}$ , через активацию оперона генов, ответственных за синтез специфических для нитратного дыхания ферментов (нитратредуктаз). Анаэробные субпопуляции биопленок возбудителя мелиоидоза обладают более выраженной способностью к адаптации, приобретая устойчивость к факторам окружающей среды, а также резистентность к действию антибактериальных препаратов, что в организме хозяина приводит к персистенции возбудителя и хронизации процесса [9].

Связь между хроническим рецидивирующим течением мелиоидозной инфекции и способностью *B. pseudomallei* к формированию биопленок выявлена в работе Limmathurotsakul D. et al. Установлено, что клинические изоляты *B. pseudomallei*, вызывающие хроническую инфекцию, обладают более



высокой биопленкообразующей способностью по сравнению с изолятами, выделенными от больных с острой формой мелиоидоза [29].

Предположительно биопленки патогенных буркхольдерий могут представлять собой постоянный источник персистирующих клеток, время от времени высвобождающихся из матрикса и диссеминирующих в ткани макроорганизма, приводя к формированию очагов хронической инфекции и способствуя рецидивированию заболевания [9, 36].

Таким образом, из приведенных в обзоре данных следует, что способность образовывать биопленки играет важную роль в формировании у патогенных буркхольдерий резистентности к антибиотикам и одновременно оказывает существенное влияние на характер инфекционного процесса. Очевидно, что повышению эффективности антибиотикотерапии мелиоидоза и сапа будет способствовать разработка и внедрение новых подходов, намечающихся в связи с изучением у патогенных буркхольдерий биопленкообразования: создание средств, нарушающих межклеточный обмен информацией (ингибиторы коммуникативных систем); применение в составе комплексной терапии препаратов, блокирующих начальные стадии образования биопленок (ингибиторов адгезии бактерий к поверхности); применение веществ, блокирующих синтез или разрушающих внеклеточный матрикс биопленки и, тем самым, облегчающих доступ антибактериальных средств; использование препаратов, обеспечивающих эффективную комбинированную терапию мелиоидоза и сапа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий. Журн. микробиол. 2003, 5: 86-93.
2. Евдокимова Н.В., Черненкокая Т.В. Персистирующие клетки микроорганизмов — новый взгляд на старую проблему. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2013, 15 (3): 192-197.
3. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
4. Balder R., Lipski S., Lazarus J.J. et al. Identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* adhesins for human respiratory epithelial cells. BMC Microbiology. 2010, 10: 250.
5. Bandeira T., Moreira C.A., Brilhante R.S. et al. In vitro activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole against biofilm of Brazilian strains of *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57 (11): 5771-5773.
6. Castelo-Branco D.S., Riello G.B., Vasconcelos D.C. et al. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. J. Applied Microbiology. 2016, 120 (3): 600-606.
7. Chan Y.Y., Chua K.L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB—OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. J. Bacteriol. 2005, 187: 4707-4719.
8. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. 2005, 18 (2): 383-416.
9. Chin C.Y., Hara Y., Ghazali A.K. et al. Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence. BMC Genomics. 2015, 16 (1): 471.
10. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistence infections. Science. 1999, 284 (5418): 1318-1322.
11. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Molecul. Biol. 2000, 64 (4): 847-867.

12. DeShazer D., Brett P.J., Carlyon R. et al. Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene. *J. Bacteriol.* 1997, 179: 2116-2125.
13. Diggle S.P., Lumjiaktase P., Dipilato F. et al. Functional genetic analysis 486 reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia 487 pseudomallei* and related bacteria. *Chem Biol.* 2006, 13: 701-710.
14. Donlan R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8 (9): 881-890.
15. Duerkop B.A., Herman J.P., Ulrich R.L. et al. The *Burkholderia mallei* BmaR3-BmaI3 quorum-sensing system produces and responds to N-3-hydroxy-octanoyl homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 2008, 190: 5137-5141.
16. Duerkop B.A., Ulrich R.L., Greenberg E.P. Octanoyl-homoserine lactone is the cognate signal for *Burkholderia mallei* BmaR1-BmaI1 quorum sensing. *J. Bacteriol.* 2007, 189: 5034-5040.
17. Essex-Lopresti A.E., Boddey J.A., Thomas R. et al. A type IV pilin, PilA, contributes to adherence of *Burkholderia pseudomallei* and virulence in vivo. *Infect. Immun.* 2005, 73 (2): 1260-1264.
18. Galyov E.E., Brett P.J., De Shazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010, 64: 495-517.
19. Gamage A.M., Shui G., Wenk M.R. et al. N-Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology.* 2011, 157: 1176-1186.
20. Horton R.E., Grant G.D., Matthews B. et al. Quorum sensing negatively regulates multinucleate cell formation during intracellular growth of *Burkholderia pseudomallei* in macrophage-like cells. *PLoS One.* 2013, 8: e63394.
21. Kamjumphol W., Chareonsudjai S., Chareonsudjai P. et al. Environmental factors affecting *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2013, 44 (1): 72-81.
22. Karatan E., Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol.* 2009, 73 (2): 310-347.
23. Kim H.S., Schell M.A., Yan Yu et al. Bacterial genome adaptation to niches: Divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. *BMC Genomics.* 2005, 6: 174.
24. Kiratisin P., Sanmee S. Roles and interactions of *Burkholderia pseudomallei* BpsIR quorum-sensing system determinants. *J. Bacteriol.* 2008, 190: 7291-7297.
25. Korbsrisate S., Vanaporn M., Kerdsuk P. et al. The *Burkholderia pseudomallei* RpoE (AlgU) operon is involved in environmental stress tolerance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters.* 2005, 252: 243-249.
26. Lazar Adler N.R., Dean R.E., Saint R.J. et al. Identification of a predicted trimeric autotransporter adhesin required for biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS One.* 2013, 8 (11): e79461.
27. Lazar Adler N.R., Stevens J.M., Stevens M.P. et al. Autotransporters and their role in the virulence of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Frontiers in Microbiology* 2011, 2: 15.
28. Lee H.S., Gu F., Ching S.M. et al. CdpA is a *Burkholderia pseudomallei* cyclic di-GMP phosphodiesterase involved in autoaggregation, flagellum synthesis, motility, biofilm formation, cell invasion, and cytotoxicity. *Infection and Immunity.* 2010, 78 (5): 1832-1840.
29. Limmathurotsakul D., Paeyao A., Wongratanacheewin S. et al. Role of *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation and lipopolysaccharide in relapse of melioidosis introduction. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20 (11): O854-O856.
30. Losada L., Ronning C.M., DeShazer D. et al. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. *Genome Biol. Evolution.* 2010, 2: 102-116.
31. Majerczyk C.D., Brittnacher M.J., Jacobs M.A. et al. Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons. *J. Bacteriol.* 2014, 196 (22): 3862-3871.
32. Mongkolrob R., Taweechaisupapong S., Tungpradabkul S. Correlation between biofilm pro-

- duction, antibiotic susceptibility and exopolysaccharide composition in *Burkholderia pseudomallei* bpsI, ppk, and rpoS mutant strains. *Microbiology and Immunology*. 2015, 59 (11): 653-663.
33. Pibalpakdee P., Wongratanacheewin S., Taweekaisupapong S. et al. Diffusion and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. *J. Antimicrob. Agents*. 2012, 39 (4): 356-359.
  34. Plumley B.A., Martina K. H., Borleea G. I. et al. Thermoregulation of biofilm formation in *Burkholderia pseudomallei* is disrupted by mutation of a putative diguanylate cyclase. *J. Bacteriol*. 2017, 199 (5): e00780-16.
  35. Puthuceary S.D. Melioidosis in Malaysia. *Med. J. Malaysia*. 2009, 64: 266-274.
  36. Sawasdidoln C., Taweekaisupapong S., Serm Swan R.W. et al. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating conditions significantly induces antimicrobial resistance. *PLoS One*. 2010, 5(2): 1-10.
  37. Schweizer H.P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol*. 2012, 7: 1389-1399.
  38. Sidrim J. J., Vasconcelos D. C., Riello G. B. et al. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. *Biofouling*. 2017, 33 (1): 88-97.
  39. Soto S.M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*. 2013, 4: 223-229.
  40. Taweekaisupapong S., Kaewpa C., Arunyanart C. et al. Virulence of *Burkholderia pseudomallei* does not correlate with biofilm formation. *Microb. Pathog*. 2005, 39 (3): 77-85.
  41. Tunpiboonsak S., Mongkolrob R., Kitudomsab K. et al. Role of a *Burkholderia pseudomallei* polyphosphate kinase in an oxidative stress response, motilities, and biofilm formation. *J. Microbiol*. 2010, 48 (1): 63-70.
  42. Ulrich R.L., Deshazer D., Brueggemann E.E. et al. Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Med. Microbiol*. 2004, 53: 1053-1064.
  43. Ulrich R.L., Deshazer D., Hines H.B. et al. Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect. Immun*. 2004, 72: 6589-6596.
  44. Valade E., Thibault F.M., Gauthier Y.P. et al. The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J. Bacteriol*. 2004, 186: 2288-2294.
  45. Vial L., Lepine F., Milot S. et al. *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *J. Bacteriol*. 2008, 190: 5339-5352.
  46. Vorachit M., Lam K., Jayanetra P. et al. Electron microscopy study of the mode of growth of *Pseudomonas pseudomallei* in vitro and in vivo. *J. Trop. Med. Hyg*. 1995, 98: 379-391.
  47. Yuen C.W., Ong E.B., Mohamad S. et al. Construction and characterization of a *Burkholderia pseudomallei* wzm deletion mutant. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2012, 22: 1336-1342.

*Поступила 05.09.17*

Контактная информация: Меринова Людмила Константиновна, д.м.н.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442) 37-36-74

---