

Поняття виду та штаму мікроорганізмів за умов формування біоплівки як надорганізмових систем

Олександра Паллаг, Надія Бойко

*Науково-дослідницький та навчальний центр молекулярної мікробіології та імунології слизових оболонок, Ужгородський національний університет (Ужгород)
s_sarvash@ukr.net, orcid <https://orcid.org/0000-0003-3636-6621>
nadiya.boyko@gmail.com, orcid <https://orcid.org/0000-0002-2467-7513>*

PALLAG, O., BOYKO, N. Concepts of species and strain in relation to microorganisms under formation of biofilms as superorganismic systems. — Nowadays, many biological terms receive new interpretations, especially the concept of species. The species is the main structural unit of living things. It emerges, develops, and, when living conditions change either disappear or transforms into other species. There is no clear and unified definition of species. The achievements of contemporary molecular genetic studies indicate that the majority of microorganisms exist mainly not in a free-floating condition, but in formed associations or consortia. Microbial interactions occur by transferring molecular and genetic information, and various mechanisms such as secondary metabolites, siderophores, quorum-sensing system, biofilm formation, and cell transduction signals can be involved in this exchange. Therefore, for a deeper understanding of the concept of "species" in biology, it is necessary to take into account not only morphological and physiological criteria, but also to consider species from the viewpoint of systems biology, and to bear in mind factors of horizontal gene transfer. Therefore, the concept of "species" can be considered in a broader context, in particular within ecosystems with all assimilation relations.

Вступ

Реалії XXI століття засвідчують необхідність нового трактування багатьох біологічних термінів. Зокрема, згідно із актуальними досягненнями сучасної біологічної науки існує потреба у новітньому трактуванні поняття «вид» в біології.

Універсального визначення виду немає, але у становленні цього поняття відіграли свою роль різні концепції. Однією з найдавніших концепцій є морфологічна концепція, основою якої є сукупність особин, які відрізняються від інших певними зовнішніми ознаками, але дана концепція не стала загально-прийнятою. Також існує біологічна концепція виду, в основі якої лежить поняття репродуктивної ізоляції і, відповідно, відсутність гібридів за умов проживання на одній території близьких видів. З позицій біологічної концепції поняття вид трактують як сукупність особин у складі популяцій, що характеризуються спадковою сукупністю ознак, вільно схрещуються спадковою подібністю ознак, вільно схрещуються і дають плодюче потомство, пристосовані до певних умов життя і займають у природі певну територію — ареал.

Загальне поняття «вид»

Поняття виду в мікробіології дещо різниться від загальноприйнятих концепцій. Поняття виду стосовно бактерій та інших прокаріотів не завжди відповідає цьому поняттю щодо вищих організмів. Це, у першу чергу, пов'язано зі значною морфологічною та фізіологічною варіабельністю мікробів. Виявлені навіть незначні, але статистично достовірні, відмінності у геномі різних штамів одного виду. Також існує визначення поняття виду, як сукупність мікроорганізмів, які мають подібні морфологічні, фізіологічні та молекулярно-генетичні ознаки, подібний обмін речовин та спільне походження.

З огляду на досягнення сучасних молекулярно-генетичних досліджень більшість мікроорганізмів існують не у вільноплаваючому стані, а у сформованих асоціаціях. Мікробні асоціації засновані на симбіотичних або метаболічних взаємозв'язках. Поняття симбіозу можна трактувати у широкому та вузькому сенсі. У широкому сенсі симбіоз охоплює всі форми тісного співжиття організмів різних видів, включаючи і паразитизм, який в цьому випадку називається антагонізмом. У вузькому значенні це співжиття двох видів, при якому обидва партнери вступають у безпосередню взаємодію із зовнішнім середовищем, регуляція стосунків з останньою здійснюється спільно зусиллями, поєднаною діяльністю обох організмів (Мошковский 1946).

Мікроорганізми рідко зустрічаються як окремі види популяції в навколишньому середовищі. Багаторічна коеволюція різних видів призводить до адаптації та призводить до великої різноманітності відносин, які можуть сприяти спільному проживанню, це можуть бути мутуалістичні та ендосимбіотичні відносини, або конкурентні, антагоністичні, патогенні та паразитарні відносини (Фауст & Раес 2012). Ці взаємодії включають усі екологічні аспекти, включаючи фізіохімічні зміни, обмін метаболітів, перетворення метаболітів, передачу сигналів, хемотаксис та генетичний обмін, що призводить до вибору генотипу. Мікробні взаємодії відбуваються шляхом передачі молекулярної та генетичної інформації, і в цьому обміні можуть бути задіяні багато механізмів, таких як вторинні метаболіти, сидерофори, система зондування кворуму, формування біоплівки та сигналізація клітинної трансдукції (Hall-Stoodley *et al.* 2008; Rawat 2015).

Ототожнення поняття «біоплівки» та «виду»

Реакція мікроорганізмів на зміну умов навколишнього середовища в біоплівках істотно відрізняється від реакції кожного окремого виду в монокультурі. Це забезпечує її фізіологічну і функціональну стабільність, і тим самим є запорукою виживання в екологічній ніші. Тому, можливо розглядати бактеріальні біоплівки з точки зору модифікації поняття «вид» в біології.

У 1978 р. введено поняття «біоплівка», згідно з яким більшість бактерій ростуть у замкнених матрицях, прикріплених до поверхонь будь-яких екосистем, де вони забезпечені живленням і містять воду (Garth 2008). Особливості функціонування мікроорганізмів у складі біоплівки суттєво відрізняються від закономірностей їх існування у планктонній формі, що визначає актуальність

дослідження структури і закономірностей формування такого бактеріального консорціуму (López & Vlamakis 2010). Крім того, ці мікробні спільноти часто складаються з безлічі видів, які взаємодіють між собою та навколишнім середовищем. Визначення архітектури біоплівки, зокрема просторового розташування мікроколоній (скупчень клітин) відносно одна одної, має глибокі наслідки для функціонування цих складних спільнот.

Важливим сигналом, який допомагає бактеріям адаптуватися до різних типів середовищ, тобто таким, що бере участь у її ініціації, є наявність 3,5-циклічної диугуанілової кислоти (c-di-GMP), яка контролює утворення, рухливість та вірулентність біоплівки (Fazli *et al.* 2014; Jenal *et al.* 2017). У процесі формування біоплівки мають місце генетичні та біохімічні механізми. Одним із таких специфічних механізмів є наявність генів, які реагують на прикріплення, та активуються лише при перебуванні культур у біоплівці.

Так, певні гени реагують на зворотне прикріплення бактеріальних клітин до поверхні, тоді як декілька десятків інших генів вмикаються при незворотній адгезії (Lewis 2010). Важливість вивчення передачі генів у природних середовищах підкреслюється появою мультирезистентних бактерій (Davies 1994), широким використанням антибіотиків для сприяння росту домашніх тварин (Witte 1998). Поширеність плазмід у бактеріях з різних середовищ існування є добре встановленою, і передача генів шляхом кон'югації є одним з найкращих механізмів розповсюдження генетичної інформації. Оскільки більшість бактерій у природних умовах перебувають у біоплівках, впливає, що кон'югація є ймовірним механізмом, за допомогою якого бактерії в біоплівках передають гени всередині або між популяціями.

Біоплівки можуть утворюватися одним штамом бактерій. Однак більшість природних біоплівок в більшості випадків утворюються багатьма видами бактерій. Полімікробне зростання призводить до міжвидових взаємодій, які передбачають спілкування, як правило, за допомогою кворум сенсингу та метаболічної співпраці. При дослідженні полібактеріальних біоплівок береться до уваги міжвидова комунікація між штамми, включаючи секреторні фактори (молекули, що сприймають кворум, вторинні метаболіти, вуглеводи та білки), які впливають на експресію генів, метаболічну співпрацю та конкуренцію, фізичний контакт та виробництво антимікробних екзопродуктів може призвести до посиленого формування біоплівки (Varposhti *et al.* 2014).

Для ряду УПМ встановлено явище синергізму при формуванні біоплівки. Так, бактерії *Klebsiella pneumoniae* та *Pseudomonas aeruginosa* здатні утворювати так звані полібактеріальні біоплівки. Під час дослідження структури такої біоплівки, виявлено, що обидва види можуть співіснувати (Schuppler & Loessner 2010), але темпи зростання *P. aeruginosa* у змішаній культурі біоплівки значно повільніші, ніж при вирощуванні їх у вигляді чистої культури біоплівки (Cegelski 2009). Разом з тим, присутність у біоплівці декількох видів бактерій має важливі переваги, а саме: такі консорціуми сприяють прикріпленню біоплівки до поверхні, сприяючи інвазії та колонізації бактерій на різних типах поверхонь (Мдинарадзе 1987).

Інтенсивна взаємодія в багатовидових біоплівках може служити рушійною силою еволюції. В роботі (Hansen *et al.* 2007) повідомляється, що в багатовидових біоплівках, утворених *Acinetobacter* spp. і *Pseudomonas putida* (*P. putida*), співіснування популяції *P. putida* залежить від бензоату, який продукує *Acinetobacter* spp. під час процесів катаболізму, який в свою чергу є джерелом вуглецю і ця полібіоплівка є більш стабільною і продуктивнішою в порівнянні з біоплівкою сформованою лише бактеріями роду *P. putida*. Адже, відомо, що одновидова біоплівка *P. putida* розсіюється у відповідь на кисневе голодування.

Існують дослідження, в яких показано формування полібактеріальних біоплівок грам-позитивними і грам-негативними бактеріями, де спостерігається пригнічення одного виду бактерій іншим. Конкурентні відносини спостерігали (Millezi 2012) між *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*, в яких кількість життєздатних клітин *S. aureus* у біоплівках зменшувалася за рахунок присутності *E. coli* (Millezi 2012) і на основі даних цих досліджень, можна зробити висновок, що відбуваються певні зміни у властивостях цього виду в полібактеріальних біоплівках.

Полімікробне зростання призводить до міжвидових взаємодій, які передбачають спілкування, як правило, за допомогою зондування кворуму та метаболічної співпраці. Взаємодія в біоплівках змішаних видів передбачає кооперативний (синергетичний), конкурентний (антагоністичний) або нейтральний характер на основі генетичного походження задіяних видів (Glaougis *et al.* 2013). І тому, актуальним стає питання модифікації поняття «виду» в біології.

Відомо також, що біоплівкоутворення є лише видовою ознакою, а навіть штамовою. Встановлено, відмінності у здатності формувати біоплівки різними штамми *Lactobacillus acidophilus* C-01, *L. acidophilus* C-02, *L. acidophilus* C-03, *L. acidophilus* C-04, що підтверджує той факт, що біоплівкоутворення є штамовою ознакою.

Поняття «вид» в рамках екосистеми

З огляду на вище наведені дані, для більш глибокого розуміння поняття «виду» в біології потрібно брати до уваги не лише морфологічні та фізіологічні критерії, як це представлено в класичних працях, а також розглядати вид з точки зору системної біології та враховувати фактори горизонтального перенесення генів. Адже, згідно сучасних досліджень відомо, що іРНК може передаватися не лише в межах одного виду, а також передається вертикально, тобто відбувається міжвидова передача генів (це і відрізняє генетику від епігенетики). І тому, поняття «вид» можна розглядати більш широко, в рамках екосистеми з усіма асиміляційними зв'язками.

Беручи до уваги досягнення сучасних молекулярно-генетичних досліджень в області вивчення людського мікробіому він є сукупністю мікробіотів, що колонізують усі поверхні людського тіла, у тому числі шкіру, дихальну систему, шлунково-кишковий тракт і сечостатеву систему та мільйонів мікробних генів, які контактують з навколишнім середовищем.

З огляду на вище написане можна розглядати людину та її мікробіом з точки зору сформованої полібактеріальної біоплівки, а саме поняття біоплівка співставляти з поняттям «вид» в біології.

Література

- Мдинарадзе, Т. Д. 1987. *Переработка побочного сырья животного происхождения*. Агропромиздат, Москва, 1–239.
- Мошковский, Ш. Д. 1946. Функциональная паразитология. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*, **4**: 21–25.
- Фауст, К., Дж. Раес. 2012. Мікробна взаємодія: від мереж до моделей. *Nature Reviews Microbiology*, **10** (8): 538–550.
- Cegelski, L., J. S. Pinkner, N. D. Hammer, C. K. Cusumano, C. S. Hung, [et al.]. 2009. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*, **5** (12): 913–919.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, **264** (5157): 375–382.
- Fazli, M., Amblad, H., Rybtke, M. L., Givskov, M., Eberl, L., Tolker-Nielsen, T. 2014. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environmental microbiology*, **16** (7): 1961–1981.
- Garth, A. I. 2008. Biofilm in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, **3** (4): 26–28.
- Giaouris, E., N. Chorianopoulos, A. Doulgeraki, G. J. Nychas. 2013. Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS One*, **8** (10): e77276.
- Hall-Stoodley, L., L. Nistico, K. Sambanthamoorthy, B. Dice, D. Nguyen, [et al.]. 2008. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC microbiology*, **8** (1): 1–16.
- Hansen S. K., Haagensen J. A., Gjermansen M., [et al.]. 2007. Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *J. Bacteriol.*, **189**: 4932–4943.
- Jenal, U., A. Reinders, C. Lori. 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, **15** (5): 271–284.
- Lewis, K. 2010. Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, **64**: 357–372.
- López, D., H. R. Vlamakis. 2010. Kolter. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2** (7): a000398.
- Millezi F. M., M. O. Pereira, N. N. Batista, N. Camargos, I. Auad, [et al.]. 2012. Susceptibility of monospecies and dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. *Journal of Food Safety*, **32** (3): 351–359.
- Rawat, S. 2015. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, **5** (4): 47–56.
- Schuppler, M., M. J. Loessner. 2010. The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *International Journal of Inflammation*, **2010**, Article ID 704321: 1–12.
- Varposhti, M., F. Entezari, M. M. Feizabadi. 2014. Synergistic interactions in mixed-species biofilms of pathogenic bacteria from the respiratory tract. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **47** (5): 649–652.
- Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, **279** (5353): 996–997.

Резюме

ПАЛДАГ, О., БОЙКО, Н. Поняття виду та штаму мікроорганізмів за умов формування біоплівки як надорганізованих систем. — Актуальним сьогодні є нове трактування багатьох біологічних термінів, а особливо поняття виду в біології. Вид є основною структурною одиницею живої природи. Він виникає, розвивається, а при зміні умов існування може зникнути або перетворитися в інші види. Єдиного визначення поняття вид на сьогодні не існує. Досягнення сучасних молекулярно-генетичних досліджень вказують більшість мікроорганізмів існують не у вільноплаваючому стані, а у сформованих асоціаціях. Мікробні взаємодії відбуваються шляхом передачі молекулярної та генетичної інформації, і в цьому обміні можуть бути задіяні багато механізмів, таких як вторинні метаболіти, сидерофори, система зондування кворуму, формування біоплівки та сигналізація клітинної трансдукції. Тому для більш глибокого розуміння поняття «виду» в біології потрібно брати до уваги не лише морфологічні та фізіологічні критерії, а також розглядати вид з точки зору системної біології та враховувати фактори горизонтального перенесення генів. І тому поняття «вид» можна розглядати більш широко, в рамках екосистеми з усіма асиміляційними зв'язками.