

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.843.1.086.3

Головин С.Н., Симонова И.Р., Титова С.В., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Тришина А.В.

ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЁНОК *VIBRIO CHOLERAЕ* МЕТОДОМ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

Холера продолжает оставаться одной из приоритетных проблем мирового здравоохранения, что определяет необходимость её постоянного мониторинга, а также дальнейшее изучение этой инфекции в микробиологическом и экологическом аспектах. Значительную роль среди механизмов, позволяющих холерным вибрионам из года в год на протяжении десятилетий сохранять свою экологическую нишу в различных водоёмах, а также распространяться в них, играет феномен биоплёнкообразования. Решающую роль в изучении процесса биоплёнкообразования сыграло применение методов электронной микроскопии. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) имеет ряд существенных преимуществ, однако исследование биоплёнок данным методом имеет определённые ограничения и особенности, сказывающиеся на получаемых результатах. Цель исследования — моделирование биоплёнок холерных вибрионов с использованием новой оригинальной методики и изучение их методом ТЭМ.

Для этого разработан оригинальный субстрат для культивирования биоплёнок холерных вибрионов, адаптированный для удобства пробоподготовки к ТЭМ. Использование данного метода многократно упрощает процесс пробоподготовки и позволяет максимально сохранять нативную структуру биоплёнок. Путём комбинирования вариантов контрастирования и сравнения полученных результатов определена роль различных составляющих в процессе биоплёнкообразования, а также показана структура матрикса биоплёнок, морфо-стадийная картина процесса биоплёнкообразования холерных вибрионов, выделены электронно-микроскопические признаки биоплёночных форм холерных вибрионов. Приведённые в работе данные помогут оптимизировать изучение биоплёнок методом ТЭМ и лучше понять феномен биоплёнкообразования.

Ключевые слова: биоплёнки; биоплёнкообразование; *Vibrio cholerae*; культивирование биоплёнок; трансмиссионная электронная микроскопия.

Для цитирования: Головин С.Н., Симонова И.Р., Титова С.В., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Тришина А.В. Изучение биоплёнок *Vibrio cholerae* методом трансмиссионной электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 568-576. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2017-62-9-568-576>

Golovin S.N., Simonova I.R., Titova S.V., Verkina L.M., Bereznyak E.A., Trishina A.V.

THE ANALYSIS OF BIOFILMS *VIBRIO CHOLERAЕ* USING TECHNIQUE OF TRANSMISSIVE ELECTRONIC MICROSCOPY

The Rostov-on-Don anti-plague institute of the Rospotrebnadzor, 344002 Rostov-on-Don, Russia

The cholera continues to be one of the priority problems of world health care that determines necessity of its permanent monitoring and also further investigation of this infection in microbiological and ecological aspects. The phenomenon of biofilm formation plays a significant role among mechanisms permitting comma bacillus year by year to retain its ecological niche and to spread in various basins over a period of decades. The application of techniques of electronic microscopy played a decisive role in studying the process of biofilm formation. The transmission electronic microscopy has a number of significant advantages, but studying of biofilms using the given technique has certain limitations and peculiarities affecting derivable results.

The purpose of study is modeling of biofilms of comma bacillus using a new original technique and analyzing them implementing transmission electronic microscopy. An original substrate was developed to cultivate biofilms of comma bacillus adjusted to convenient sampling preparation for transmission electronic microscopy. The application of the given technique manifold simplifies the process sampling preparation and permits to retain at most the native structure of biofilms. By means of combining alternatives of contrasting and comparing of obtained results the role of various components in the process of biofilm formation is determined. Also, the structure of matrix of biofilms and morphologic phasic picture of process of biofilm formation of comma bacillus is demonstrated. The electronic microscopic indications of biofilm forms of comma bacillus are marked out. The presented data supports optimization of studying biofilms using transmission electronic microscopy and better understanding phenomenon of biofilm formation.

Key words: biofilm; biofilm formation; *vibrio cholerae*; cultivation of biofilms; transmission electronic microscopy

For citation: Golovin S.N., Simonova I.R., Titova S.V., Verkina L.M., Bereznyak E.A., Trishina A.V. The analysis of biofilms *Vibrio cholerae* using technique of transmissive electronic microscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (9): 568-576. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-568-576>

For correspondence: Simonova I.R., head of the group of electronic microscopy of the laboratory of biological security and treatment. e-mail: labbibebez@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.04.2017
Accepted 25.05.2017

Введение. Холера продолжает оставаться одной из приоритетных проблем мирового здравоохранения в связи с существованием угрозы возникновения чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера, имеющих международное значение и проявляющихся в виде масштабных эпидемий и вспышек. Так, по данным на начало 2017 г., в мире зарегистрировано более 17 тыс. больных холерой в 19 странах мира [1]. Это определяет необходимость постоянного мониторинга холеры, являющегося одним из основных компонентов надзора за эпидемическими инфекционными болезнями на глобальном и территориальном уровнях, а также дальнейшего изучения этой инфекции в микробиологическом и экологическом аспектах. Значительную роль среди механизмов, позволяющих холерным вибрионам из года в год на протяжении десятилетий сохранять свою экологическую нишу в различных водоёмах, а также распространяться в них, несомненно, играет феномен биоплёнокообразования [2].

В настоящее время известно, что в естественной среде обитания до 99% всех микроорганизмов существуют в виде биоплёнок — организованных сообществ бактерий, представляющих собой динамически изменяющуюся в пространстве и времени структуру, состоящую из активно функционирующих клеток и покоящихся форм, заключённых в экстрацеллюлярный матрикс, которая формируется на границе раздела твёрдой и жидкой или твёрдой и газообразной фаз [3, 4].

Решающую роль в изучении процесса биоплёнокообразования сыграло применение методов электронной микроскопии, которая в настоящее время даёт единственную возможность для объективной визуализации ультраструктуры биоплёнок [5]. Метод электронной микроскопии представлен несколькими её видами, различающимися по принципу взаимодействия детективной части применяемых приборов с исследуемым объектом и определяемыми параметрами. Наиболее часто для исследования биоплёнок применяют трансмиссионную (просвечивающую) электронную микроскопию (ТЭМ), растровую (сканирующую) электронную микроскопию и атомно-силовую (зондовую) микроскопию [6—9].

ТЭМ имеет ряд существенных преимуществ, позволяющих визуализировать как поверхностные структуры образца, так и внутренние, а применение метода ультратонких срезов, томографии, гистохимических методов и иммунофлуоресценции позволяет получить цельную комплексную картину структуры и состава исследуемого образца [10, 11].

Однако исследование биоплёнок методом ТЭМ имеет определённые ограничения и особенности, сказывающиеся на получаемых результатах. Ограничением является толщина исследуемого образца. Для изучения методом ТЭМ исследуемые объекты должны иметь толщину не более 100 нм, в связи с этим основной проблемой, возникающей при исследовании биоплёнок, является необходимость отделения плёнки от субстрата и перенос на опорные сетки, что неизбежно приводит к нарушению её первоначальной структуры и невозможности изучения характера взаимодействия с субстратом.

Особенности процедуры пробоподготовки по классической схеме, включающей обезвоживание в серии спиртов восходящей концентрации, пропитку смолой и полимеризацию, также влияют на структуру биоплёнки вследствие воздействия на нее сил поверхностного натяжения и вымывания компонентов матрикса при много-

кратном погружении исследуемых образцов в различные агрессивные жидкости.

Цель данного исследования — моделирование биоплёнок холерных вибрионов с использованием новой оригинальной методики и изучение их методом ТЭМ.

Для решения этой задачи нами сконструировано оригинальное приспособление, представляющее собой субстрат для культивирования биоплёнок холерных вибрионов, адаптированный для удобства осуществления пробоподготовки к ТЭМ (приоритетная справка № 2017108346 от 13.03.2017 г.).

Материал и методы. В исследовании использованы бактерии *Vibrio cholerae* El Tor штамм 5879 и *Vibrio cholerae* El Tor штамм 19667 из коллекции музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора.

Контроль жизнеспособности микробных клеток определяли двумя методами: с помощью специфической флюоресценции с использованием набора «FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit» (согласно методикам фирмы-изготовителя «Invitrogen») и путём определения колониеобразующих единиц (КОЕ) из исходной концентрации микробной взвеси 10^2 микробных кл./мл с высеиванием на плотную питательную среду (агар Мартена с pH 7,6—7,8) и подсчётом числа образовавшихся колоний через 24 ч.

Холерные вибрионы культивировали на агаре Мартена (pH 7,6—7,8). Через 24 ч инкубации при 37°C бактериальную массу суспендировали в стерильной водопроводной воде до показателя мутности 0,5 Ед по шкале McFarland на приборе Densi-La-Meter II («Erba Lachema»). Взвесь содержала 10^6 КОЕ/мл холерных вибрионов. Далее путём кратного разведения из неё получали маточную суспензию для моделирования биоплёнок, содержащую 10^3 КОЕ/мл холерных вибрионов.

Субстрат для культивирования биоплёнок готовили по оригинальной методике.

Маточную суспензию холерных вибрионов в количестве 50 мл вносили в ёмкость с субстратом и культивировали при комнатной температуре в статических условиях без дополнительной аэрации. Сроки культивирования определялись задачами конкретного эксперимента.

Фиксацию биоплёнок осуществляли 3,6% раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 7,2—7,4), постфиксацию — 2% водным раствором тетраоксида осмия (VIII). Контрастирование образцов осуществляли по методу J.H. Luft [12, 13] и тетраоксидом осмия (VIII) [14].

После высушивания образцы биоплёнок исследовали методом ТЭМ в электронном микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

Результаты. Для подготовки образцов к исследованию методом ТЭМ необходимо было исключить необходимость отделения биоплёнки от субстрата и минимизировать механическое и химическое воздействия на неё во время осуществления различных манипуляций.

Для решения этой задачи нами было сконструировано оригинальное приспособление, представляющее собой субстрат для культивирования биоплёнок холерных вибрионов, адаптированный для удобства осуществления пробоподготовки к ТЭМ.

Первоначально получали формваровую плёнку по

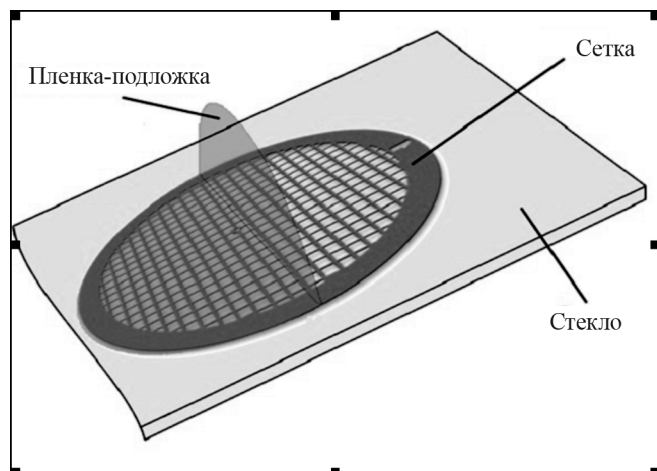


Рис. 1. Субстрат для культивирования биоплёнок.

стандартной методике [15]. Готовили 1% раствор поливинилформалина (формвара) в дихлорэтано, который выдерживали сутки при комнатной температуре для полного растворения. В этот раствор наполовину погружали предметное стекло на 10 с, затем извлекали, сушили в вертикальном положении на фильтровальной бумаге в течение 1 мин, получая на стекле плёнку. Плёнку надрезали по периметру и вместе со стеклом погружали под углом 45° в ёмкость с дистиллированной водой, где происходило отделение плёнки от стекла.

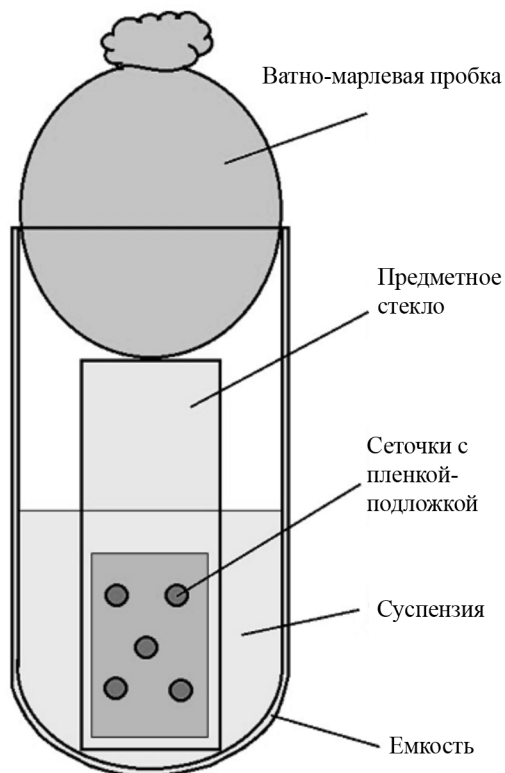


Рис. 2. Культивирование биоплёнок холерных вибрионов.

На плавающую на поверхности воды плёнку помещали 5 медных сеточек для электронной микроскопии с количеством ячеек 200 меш, а сверху накладывали предметное стекло, быстро погружая вместе с плёнкой в воду, затем переворачивали и извлекали, получая субстрат, состоящий из стекла, на котором размещены медные сеточки, покрытые формваровой плёнкой (рис. 1).

Стерилизацию субстрата, в силу неустойчивости формваровой плёнки при высоких температурах, осуществляли методом тиндализации при температуре 70°C в течение 3 сут с ежесуточным часовым инкубированием при 37°C.

После стерилизации субстрата маточную суспензию холерных вибрионов в количестве 50 мл вносили в ёмкость с субстратом и культивировали при комнатной температуре в статичных условиях без дополнительной аэрации (рис. 2). Сроки культивирования определялись задачами конкретного эксперимента.

Полученные биоплёнки извлекали из маточной суспензии, отмывали от планктонных клеток в фосфатном буфере (pH 7,2—7,4) и фиксировали-контрастировали по следующей схеме, предложенной J. Luft [12, 13] для визуализации углеводного компонента матрикса (далее — схема 1):

а) 3,6% раствор глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 7,2—7,4) с 0,02% водным раствором рутениевого красного 1:1 — 1 ч при 4°C;

б) промывка в фосфатном буфере (pH 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре;

в) 2% водный раствор тетраоксида осмия (VIII), 0,2% водный раствор рутениевого красного, фосфатный буфер (pH 7,2—7,4), соотношение 2:1:1 — 1 ч при комнатной температуре;

г) промывка в фосфатном буфере (pH 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре.

Для визуализации белкового компонента матрикса биоплёнки использована следующая схема фиксации и контрастирования [14] (далее — схема 2):

а) 3,6% раствор глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 7,2—7,4) — 1 ч при 4°C;

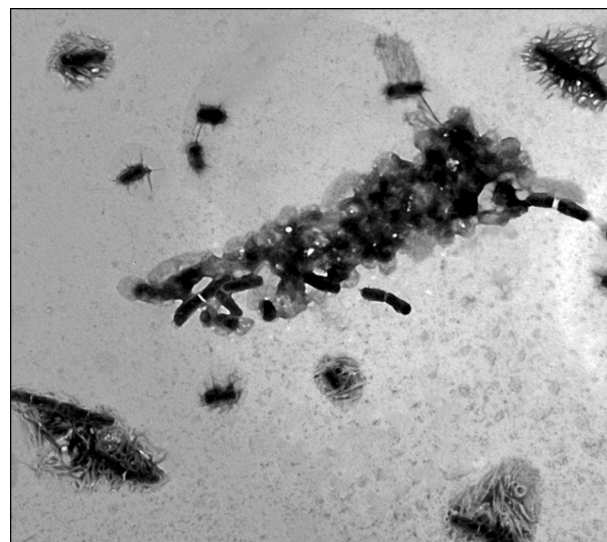


Рис. 3. Биоплёнка *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 8000).

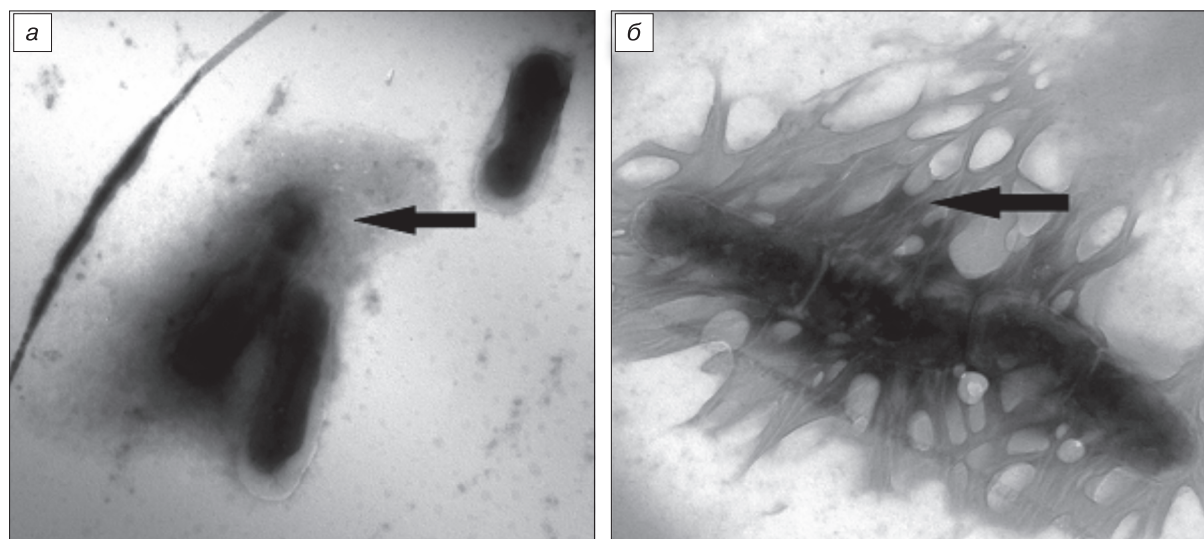


Рис. 4. Визуализация белкового (а) и углеводного (б) компонентов матрикса биоплёнки холерных вибрионов (стрелками указано вещество матрикса).

а — биоплёночная форма *V. cholerae* El Tor 19667, 10-е сутки (контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), ув. 30 000); б — биоплёночная форма *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 40 000).

б) промывка в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре;

в) 2% водный раствор тетраоксида осмия (VIII) — 1 ч при комнатной температуре;

г) промывка в фосфатном буфере (рН 7,2—7,4) — 10 мин при комнатной температуре.

После высушивания сетки с образцами биоплёнок отделяли пинцетом от предметного стекла и помещали в держатель для дальнейшего исследования методом ТЭМ.

Обсуждение. Предложенный способ культивирования позволил получить полноценную биоплёнку холерных вибрионов, полностью сохранившую связь с субстратом и обладающую характерными морфологическими признаками.

Использованная для пробоподготовки схема 1 позволила одновременно обеззараживать, фиксировать и контрастировать биоплёнку.

Общий вид биоплёнки *Vibrio cholerae* El Tor (штамм 5879) представлен на рис. 3.

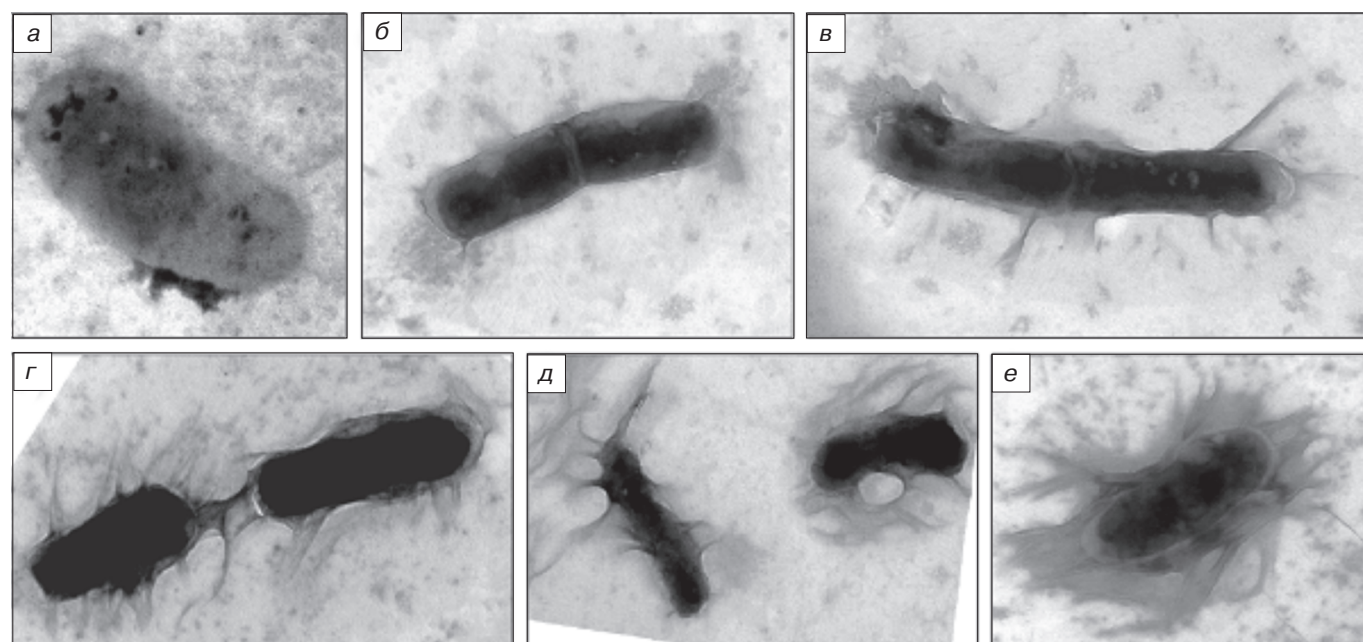


Рис. 5. Клетки *V. cholerae* El Tor 5879 на разных этапах формирования биоплёнки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия).

а — планктонная форма; б, в — адгезия планктонных клеток к поверхности субстрата; г, д — созревание биоплёнки; е — зрелая биоплёнка.

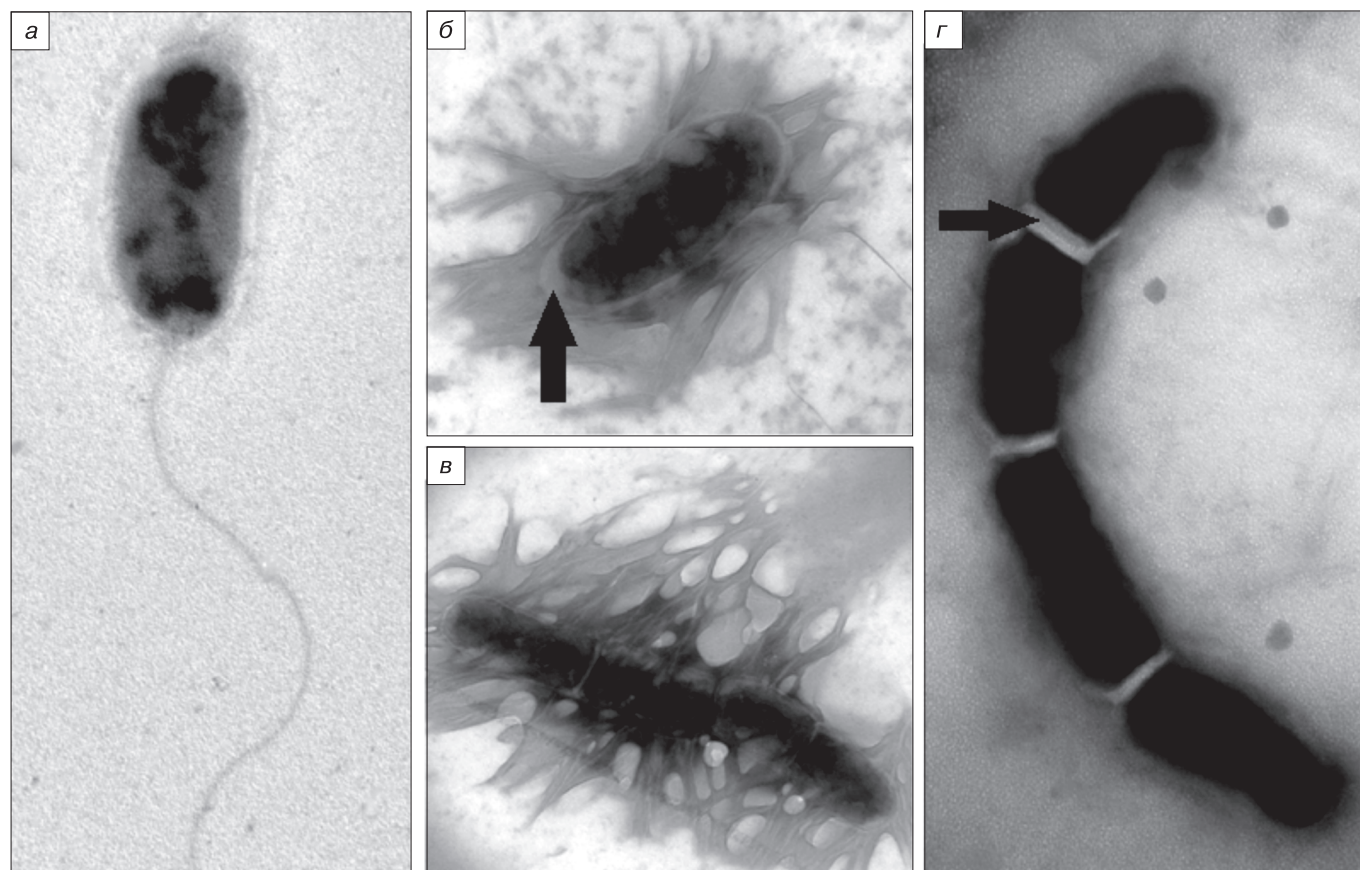


Рис. 6. Клетки планктонной и биоплёночной культур холерных вибрионов.

a — планктонная форма *V. cholerae* El Tor 5879, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), ув. 20 000); *б* — биоплёночная форма *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 40 000; стрелка указывает на капсулу); *в* — цепочки клеток биоплёночной формы *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия (контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), ув. 40 000); *г* — цепочки клеток биоплёночной формы *V. cholerae* El Tor 19667, 10-е сутки (контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), ув. 30 000; стрелка указывает на линию деления).

На первом этапе катионы рутениевого красного связываются с отрицательно заряженными полисахаридами матрикса. Поскольку рутениевый краситель не обладает электронной плотностью при ТЭМ, на втором этапе мы добавляли тетраоксид осмия (VIII), который, являясь сильным окислителем, восстанавливается до низших окислов, а те в свою очередь взаимодействуют с рутениевым красным, который связан с матриксом. Рутениевый краситель не проникает в клетку [13, 16], поэтому в комплексе с оксидами осмия контрастирует только внеклеточный матрикс [12, 13], а оксиды осмия проникают через мембрану и контрастируют бактериальные клетки [14].

Использование для пробоподготовки схемы 1 позволяет визуализировать только белковый компонент матрикса, так как тетраоксид осмия (VIII) не контрастирует углеводы [14].

Для сравнения на рис. 4 представлены два фрагмента биоплёнки с визуализацией белкового (*a*) и углеводного (*б*) компонентов матрикса.

Как видно, основная структура экстрацеллюлярного матрикса представлена углеводным компонентом — экзополисахаридом, что подтверждают различные исследования. Он же формирует и архитектуру матрикса, образуя нитевидные выросты, отходящие от клеток и

прикрепляющиеся вторым концом к субстрату. При этом количество складок и тяжей зависит от степени зрелости биоплёнки, и в пределах одного образца встречаются участки формирующейся биоплёнки с разной степенью зрелости.

При детальном изучении биоплёнки при больших увеличениях можно проследить изменение морфологии клеток на разных этапах биоплёнокообразования от планктонной формы до зрелой биоплёнки (рис. 5).

Согласно последним данным, процесс биоплёнокообразования можно разделить на следующие этапы [17]:

1. Обратимая адгезия планктонных клеток к поверхности субстрата, связанная с действием неспецифических сил взаимодействия (силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные, электростатические и дисперсионные силы Лондона).

2. Необратимая адгезия бактерий к субстрату посредством жгутиков и пилей IV типа, адгезинов, фимбрий и др.

3. Созревание биоплёнки, во время которого адгезированные бактерии начинают синтезировать внеклеточное полимерное вещество, к которому прикрепляются также вторичные колонизаторы из планктонных форм.

4. В стадии зрелой биоплёнки бактерии практически не делятся, так как этому препятствует окружающий их матрикс, но сохраняют высокую жизнеспособность.

5. Дисперсия, т. е. разрушение зрелой биоплёнки с вторичной планктонизацией, наступает через определённый период под действием собственных бактериальных сурфактантов и др. веществ, в результате чего высвободившиеся клетки получают питательные вещества и способность к делению.

Таким образом, полученные нами результаты соответствуют данной морфо-стадийной характеристике.

У клеток, находящихся в составе биоплёнки, наблюдаются изменения размеров, формы и субмикроскопической организации клеточных компонентов.

На рис. 6 представлены клетки *V. cholerae* El Tor штамм 5879 в планктонной (а) и биоплёночной (б) формах.

Обращает на себя внимание колокализация клеток в биоплёнке — в некоторых участках они расположены цепочками, что нехарактерно для планктонных клеток в жидкой среде. Между клетками четко видна линия деления, а образование цепочек в плоскости деления объясняется, по-видимому, адгезией материнских клеток к субстрату и удерживанием дочерних клеток веществом матрикса. Помимо колокализации биоплёночные формы отличаются от планктонных тем, что окружены электронно-прозрачной капсулой и заключены в экстрацеллюлярный матрикс с филаментоподобными образованиями (при контрастировании по схеме 1). Также необходимо отметить отсутствие у клеток, входящих в состав биоплёнки, жгутиков.

Эти особенности мы предлагаем считать электронно-микроскопическими признаками биоплёночных форм холерных вибрионов.

Заключение. В работе показано успешное применение ТЭМ для изучения биоплёнок холерных вибрионов. Использование разработанного нами нового метода культивирования биоплёнок, адаптированного для исследования методом ТЭМ, многократно упрощает процесс пробоподготовки и позволяет максимально сохранять нативную структуру биоплёнок. Комбинируя варианты контрастирования и сравнительные полученные результаты, можно определять роль различных составляющих в процессе биоплёнокообразования, а также изучать структуру матрикса. Данные методики помогут оптимизировать изучение биоплёнок методом ТЭМ и лучше понять феномен биоплёнокообразования.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—3, 6, 10—16 см. REFERENCES)

1. Об эпидемиологической ситуации по холере в мире на 03.03.2017. Информационный бюллетень РостПЧИ № 6 об эпидемиологической ситуации по холере в мире. Ростов-на-Дону; 2017 г. Available at: http://antiplague.ru/cholera_03-03-2017/
4. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоплёнка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*. 2007; 76(2): 149—163.
5. Соколова Т.Н. Микробные биоплёнки и способы их обнаружения. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2014; 4(48): 12—5.
7. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А., Гурьев Е.Л., Ломинадзе Г.Г. Современные технологии исследования бактериальных биоплёнок. *Современные технологии в медицине*. 2013; 5(1): 14—20.

8. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г. Ультраструктура биоплёнок при внутривидовом и межвидовом взаимодействии условно патогенных бактерий. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2014; 1: 1—11.
9. Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., Фролова Я.Н., Лабушкина А.В. Способность к формированию биоплёнки возбудителем дифтерии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 2: 36—8.
17. Харсеева Г.Г., Фролова Я.Н., Миронов А.Ю. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346—54.

REFERENCES

1. About the epidemiological situation of cholera in the world on 03/03/2017. Information bulletin of the ROSHI No. 6 on the epidemiological situation of cholera in the world. Rostov-on-Don, 2017. Available at: http://antiplague.ru/cholera_03-03-2017/.
2. Yan J., Nadell C.D., Bassler B.L. Environmental fluctuation governs selection for plasticity in biofilm production. *ISME J*. 2017. Available at: <https://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/full/ismej201733a.html>
3. Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. *Microbial Biofilms*. 2nd Ed ASM Press; Washington, DC: 2015. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880100/>
4. Nikolaev Ju.A., Plakunov V.K. Biofilm — «city of microbes» or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologiya*. 2007; 76(2): 149—63. (in Russian)
5. Sokolova T.N. Microbial biofilms and ways of their detection. *Zhurnal Grodenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 4(48): 12—5. (in Russian)
6. Mohammed S.A., Vienna M.E., Penny M.R., Hilton S.T., Mordan N., Knowles J.C. Confocal laser scanning, scanning electron, and transmission electron microscopy investigation of *Enterococcus faecalis* biofilm degradation using passive and active sodium hypochlorite irrigation within a simulated root canal model. *Microbiology Open*. 2017. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.455/pdf>
7. Chebotar' I.V., Pogorelov A.G., Jashin V.A., Gur'ev E.L., Lominadze G.G. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2013; 5(1): 14—20. (in Russian)
8. Rybal'chenko O.V., Bondarenko V.M., Orlova O.G. Ultrastructure features in biofilms during opportunistic bacteria intraspecific and interspecific interactions. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*. 2014; 1: 1—11. (in Russian)
9. Harseeva G.G., Mironov A.Ju., Frolova Ja.N., Labushkina A.V. Diphtheria causative agent capacities to form biofilm. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 36—8. (in Russian)
10. Wu S., Baum M.M., Kerwin J., Guerrero-Given D., Webster S., Schaudinn C. et al. Biofilm-specific extracellular matrix proteins of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Pathog Dis*. 2014; 72(3): 143—60.
11. Lara H.H., Romero-Urbina D., Pierce G., Lopez-Ribot J.L., Arellano-Jimenez M.J., Jose-Yacamán M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J. Nanobiotechnology*. 2015; 13: 91.
12. Luft J.H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use, and mechanism of action. *The Anatomical Record*. 1971; 3(171): 369—415.
13. Luft J.H. Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Feder. Proc*. 1967; 25: 1733—83.
14. Bahr G.F. Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. *Exp. Cell. Res*. 1954; 7: 457—79.
15. Pease D.C. *In Histological Techniques for Electron Microscopy*. 2nd ed. New York and London: Academic Press; 1964.
16. Tani E., Ametani T. Substructure of microtubules in brain nerve cells as revealed by ruthenium red. *J. Cell. Biol*. 1970; 46(1): 159—65.
17. Harseeva G.G., Frolova Ja.N., Mironov A.Ju. Biofilms of Pathogenic Bacteria: Biological Properties and Their Role in Chronization of Inflammatory Process. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(4): 346—54. (in Russian)

Поступила 20.04.17
Принята к печати 25.05.17