

УДК 579.262: 579.22

АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* 33 К НЕКОТОРЫМ ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

В. П. Коробов^{a,b}, Л. М. Лемкина^a, В. И. Монахов^b

^aПермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15, e-mail: biodin@psu.ru

^bИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: info@iegm.ru

Изучены процессы формирования биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis* 33 на поверхностях стекла, медицинских катетеров и микробиологических планшетов. Показано, что динамика накопления биомассы пленок на богатой среде LB во многом отражает кинетику роста планктонных бактериальных культур. Наиболее выраженное образование биопленок происходит на поверхностях катетеров и планшетов, обладающих гидрофобными свойствами. Максимальный уровень биомассы пленок обнаруживается при культивировании в нейтральной зоне pH. Вместе с тем интенсивное развитие биопленок происходит и при повышенной кислотности (pH 4.0), а также в слабощелочной зоне (pH 8.0). Введение в среду культивирования глюкозы (1.0%), галактозы (0.1–1.0%) и маннозы (0.5–1.0%), а также ионов Mg²⁺, Ca²⁺, или Mn²⁺ в концентрациях 0.05–12.5 mM приводит к значительному ингибированию образования биопленок. Результаты исследований свидетельствуют о значительных изменениях метаболизма бактерий *S. epidermidis* 33 и его регуляции, по-видимому, способствующих образованию этими бактериями биопленок при заселении и колонизации различных поверхностей.

Ключевые слова: биопленки, *Staphylococcus epidermidis*, колонизация поверхности, условия культивирования, гидрофобность

Введение

Бактериальные биопленки – это организованные сообщества бактерий одного или нескольких видов, состоящие из активно функционирующих клеток и их покоящихся форм, включенных в покрывающий различные доступные поверхности внеклеточный матрикс (Davey, O'Toole, 2000). Несмотря на то, что биопленки бактерий (маты) были открыты сравнительно давно (McCoу et al., 1981), исследование этих микробиологических объектов приобрело систематический характер лишь в последнее десятилетие. Вероятно, это связано с тем, что функционирование этих особых бактериальных агрегаций в ряде случаев значительно осложняет практическую деятельность человека. Так, установлено, что многие хронические инфекции животных и человека обусловлены способностью бактерий расти в виде биопленок на поверхностях их кожных покровов, слизистых и ран. При этом критическое значение имеет изменение биологических свойств бактерий в биопленках, которое приводит к возрастанию их патогенного потенциала за счет недоступности в этом состоянии для специфических и неспецифических защитных им-

мунных систем колонизированного макроорганизма, устойчивости к действию антибиотиков и других неблагоприятных факторов (Романова и др., 2006; Watnick, Kolter, 2000). Следует также отметить, что бурное развитие высокотехнологичных направлений медицины значительно расширило лечебное применение различных долгосрочных инвазивных устройств – от сосудистых катетеров до сердечных клапанов, кардиостимуляторов, глазных протезов и даже информационно-коммуникационных микрочипов (Habash, Reid, 1999). К сожалению, функционирование этих лечебных устройств часто сопровождается заселением их поверхностей оппортунистической микрофлорой, главным образом, коагулазонегативными стафилококками, с развитием т.н. катетер-ассоциированных инфекций (Donlan, Costerton, 2002).

Представленное определяет необходимость детального изучения механизмов формирования биопленок инфицирующих бактерий, которое, помимо фундаментального интереса, необходимо для разработки эффективных способов предупреждения образования и подавления функционирования этих высокоорганизованных бактериальных структур.

Цель настоящей работы – изучение влияния условий культивирования на формирование биопленок коагулазонегативных стафилококков.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали штамм бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33, полученный из ГНИИСКМБП им. Тарасевича. Формирование биопленок проводили на различающихся по физико-химическим свойствам поверхностях: стекла (предметные стекла “Huida”, Китай), венозных катетеров (поливинилхлорид, “Tegam”, Италия) и иммунологических микропланшетов (полистирол, “Медполимер”, Россия).

На логарифмической фазе роста культуры *S. epidermidis* 33 на среде Luria-Bertani (LB) отбирали аликвоты, бактериальные клетки осаждали при 3000 g в течение 10 мин, дважды промывали в физиологическом растворе и после суспендирования в среде LB до $OD_{600}=0.015$ пипетировали в объемах 100 мкл в иммунологические микропланшеты. Хорошо обезжиренные автоклавированные предметные стекла и фрагменты катетеров (длина 5 мм, диаметр 1.5 мм) помещали во флаконы с аналогичной бактериальной взвесью. Биопленки выращивали в термостате при 37°C в статических условиях без дополнительной аэрации. После окончания культивирования планктонные бактерии осторожно удаляли отсасыванием. При необходимости дальнейшего культивирования после удаления планктонной части в лунки планшетов вносили первоначальный объем свежей среды LB. По завершению культивирования поверхности биопленок промывали 0,01 М фосфатным буфером (pH=7.2) и окрашивали 0.1% генциан-виолетом в течение 10 мин. Учет биомассы пленок осуществляли измерением количества связанного с ними красителя, который после однократного промывания пленок физраствором и высушивания при

комнатной температуре экстрагировали этанолом. Измерение оптической плотности этанольных экстрактов проводили на спектрофотометре PD-303, при длине волны 570 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Для сравнения интенсивности образования биопленок на разных поверхностях рассчитывали количество связанного биопленками красителя на единицу площади, равную 1 мм².

Изучение развития биопленок при дополнительном внесении в среду роста различных углеводов, хлоридов магния, кальция и марганца, также при изменении ее исходной кислотности (внесением 0.1M HCl или 0.1M NaOH) проводили на полистироловых микропланшетах после культивирования в течение 24 час.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали компьютерные программы Microsoft Excel 2000, Statistica (версия 5.0 for Windows), рассчитывая среднее арифметическое значение, доверительные интервалы и стандартное отклонение. Статистическую значимость результатов определяли при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Изучение формирования биопленок *S. epidermidis* 33 проводили при культивировании в течение 7 сут, с ежедневной детекцией динамики их биомассы.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, образование биопленок наблюдалось на всех использованных поверхностях. Интересно отметить, что динамика роста биопленок во всех случаях в значительной степени напоминала таковую планктонных культур с хорошо выраженными физиологическими фазами – логарифмической, торможения роста и стационара. На венозных катетерах и в планшетах рост биопленок наблюдался вплоть до 6 сут культивирования, а затем в обоих вариантах

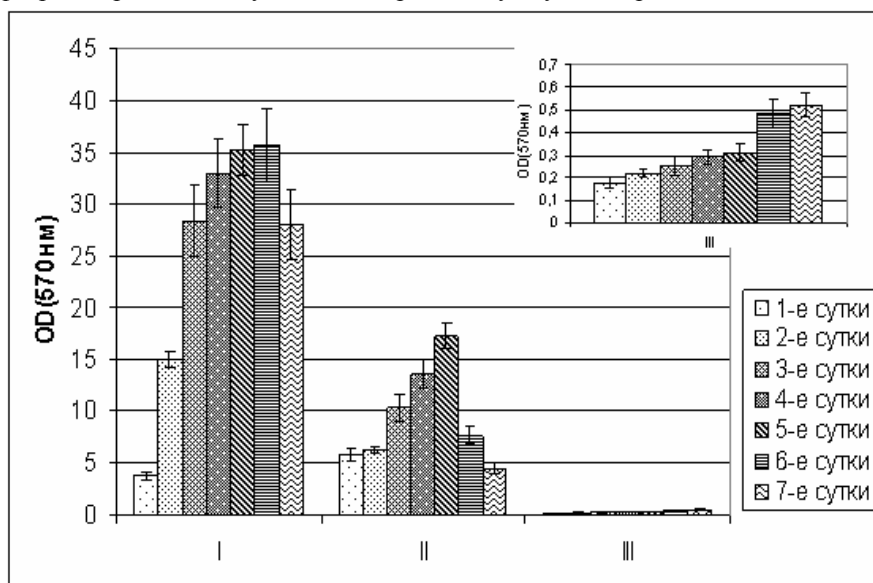


Рис. 1. Накопление биомассы пленок *S. epidermidis* 33 на поверхностях: I – поливинилхлорида (катетеры), II – полистирола (планшеты) и III – стекла

следовало резкое снижение их биомассы. Наибольшее накопление биомассы пленок к этому сроку происходило на венозных катетерах, превосходя, практически, в 2 раза содержание биопленок в микропланшетах. Образование пленок на стекле на несколько порядков уступало рассмотренным выше поверхностям, однако, необходимо отметить, что в течение всего срока эксперимента и в этом случае наблюдался перманентный рост биомассы клеток (рис. 1, вставка). Важно отметить, что при изучении формирования пленок на стеклянной поверхности нам не удалось зафиксировать снижения их биомассы при использованных сроках культивирования. Возможно, формирование биопленок на стекле происходит в течение более длительного времени. Высокие гидрофильные свойства поверхности стекла, в отличие от выраженных гидрофобных свойств полимерных поверхностей катетеров и планшетов, по-видимому, значительно затрудняют первоначальные события при формировании бактериальных пленок в этих условиях – адсорбцию – «приклеивание» бактерий к стеклу и, как следствие, тормозят включение сигнальной системы “quorum-sensing” (Dickschat, 2010), замедляя колонизацию этой поверхности.

Исследования показали, что рост биопленок *S. epidermidis* 33 во многом определяется уровнем кислотности среды. Картина накопления биомассы бактериальных пленок при различных исходных значениях pH среды культивирования представлена на рис. 2.

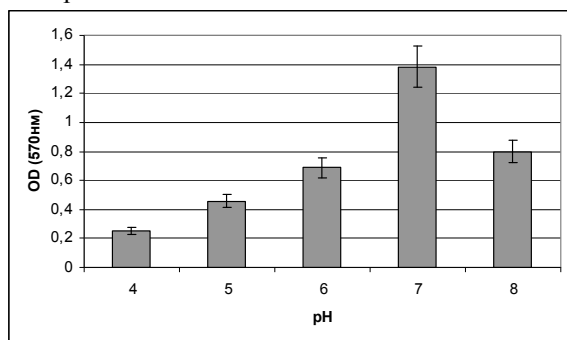


Рис. 2. Формирование биопленок *S. epidermidis* 33 при культивировании в микропланшетах на среде LB (24 ч) с различным исходным значением pH

Наибольшая биомасса пленок была зафиксирована в нейтральной зоне pH, которая является оптимальной для роста планктонной культуры *S. epidermidis* 33 (Полюдова, 2004) и близка к значению pH среды естественных мест обитания этих бактерий. Вместе с тем, обращает на себя внимание хорошо выраженное образование биопленок как при кислой, так и слабощелочной реакции среды. Это может рассматриваться в качестве важной физиологической особенности метаболизма стафилококков, способствующей образованию этими бактериями биопленок при экстремальных значениях кислотности среды.

Известно, что внеклеточный матрикс биопленок стафилококков включает все основные полимеры бактериальных клеток – высокомолекулярные полисахариды, нуклеиновые кислоты и белки (Gotz, 2002). В связи с этим особый интерес представляло изучение возможных зависимостей накопления биомассы пленок от содержания в среде роста различных моносахаридов как источников энергии, так и пластического материала.

Внесение в среду глюкозы, галактозы или маннозы, непосредственных предшественников синтеза полиуглеводных компонентов матрикса биопленок стафилококков, привело к неожиданным результатам (рис. 3). Так, введение в богатую среду LB глюкозы в небольших концентрациях (0.1% и 0.5%) при культивировании в течение 24 часов, практически, не сказывалось на биомассе бактериальных пленок, а увеличение концентрации этого углевода в среде до 1% сопровождалось значительным, более чем на 40%, снижением этого показателя. Значительное ингибирование образования биопленок *S. epidermidis* 33 вызывало также внесение в среду роста галактозы и маннозы.

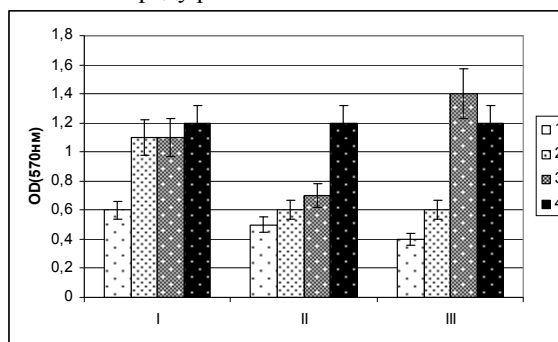


Рис. 3. Влияние внесения в среду культивирования углеводов на рост биомассы пленок *S. epidermidis* 33:

I – глюкоза; II – галактоза; III – манноза;
концентрации углеводов: 1 – 1%; 2 – 0.5%; 3 – 0.1%;
4 – контроль (исходная среда)

Результаты этих экспериментов, по-видимому, свидетельствуют о том, что питательные компоненты среды LB полностью обеспечивают потребности систем биосинтеза углеводных компонентов биопленок *S. epidermidis* 33. Полученные данные могут быть объяснены функционированием в биопленках стафилококков механизмов близких к каталитической репрессии образования пленок, обнаруженных у бактерий некоторых видов семейства *Enterobacteriaceae* (Jackson et al., 2002). Учитывая данные о наличии в пленках стафилококков белковых компонентов (Gotz, 2002), было проведено изучение влияния на рост биомассы пленок ионов биологически активных металлов, так как известно, что активность внеклеточных протеаз и пептидаз во многом определяется концентрацией некоторых двухвалентных катионов (Alekseev et al., 1985; Ye et al., 2004; Mikhailova et al., 2005). Результаты экспериментов показали, что возрастание концентрации ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} в среде

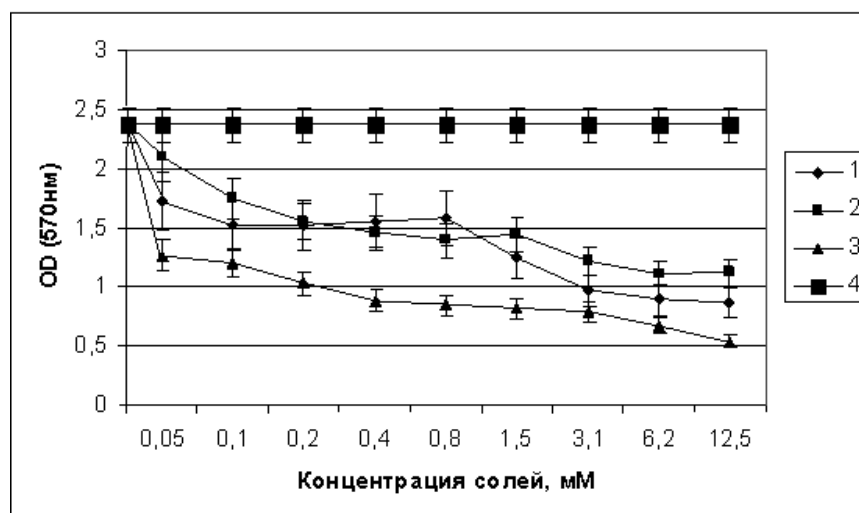


Рис. 4. Влияние двухвалентных катионов на формирование биопленки *S. epidermidis* 33 (24 ч):
1 – Ca²⁺; 2 – Mg²⁺; 3 – Mn²⁺, 4 – контроль

культивирования ведет к снижению образования биопленок.

Как видно из данных, представленных на рис. 4, образование биопленок стафилококков на полистироловом субстрате в значительной мере подавляется всеми использованными в работе катионами. Возрастание в среде ионов Mn²⁺ до 12,5 мМ снижает способность бактерий образовывать биопленки примерно 5 раз. Наличие в среде культивирования катионов Ca²⁺ и Mg²⁺ снижает интенсивность формирования пленок в 2 и 3 раза, соответственно.

Выраженное ингибирование образования биопленок *S. epidermidis* 33 при введении в среду роста ионов Ca²⁺, Mg²⁺ и Mn²⁺ может рассматриваться как следствие активации внеклеточных протеолитических ферментов (Gossas, Danielson, 2006), приводящей к дефициту полноценных белковых компонентов, необходимых для построения матрикса формирующихся биопленок коагулазонегативных стафилококков.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что динамика формирования биопленок бактериями *S. epidermidis* 33, по видимому, во многом определяется физико-химическими свойствами оккупируемой поверхности, направленными изменениями метаболизма бактериальных клеток и уровнем активности внеклеточных гидролитических систем.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности, инноваций и науки Пермского края № 07-04-96070-р_урал_а, № 10-04-96086-р_урал_а, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Программы междисциплинарных фундаментальных исследований Президиума Уральского отделения РАН.

Библиографический список

- Полудова, Т.В. Изучение феномена продукции низкомолекулярного антибактериального пептидного фактора культурой *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Полудова Татьяна Вячеславовна. Пермь, 2004. 26 с.
- Романова, Ю.М. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий / Ю.М. Романова, Т.А. Смирнова, Л.А. Андреев [и др.] // Микробиология. 2006. Т. 75, № 4. С. 556–561.
- Alekseev, A.N. Amino acid and mineral element content and the activity of various enzymes in germinating spores of *Bacillus thuringiensis* / A.N. Alekseev, L.N. Karabanova, O.A. Krainova [et al.] // Mikrobiologiya. 1985. Vol. 2. P. 181–185.
- Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Microbiol. Mol. Biol. 2000. Vol. 64. P. 847–867.
- Dickschat, J.S. Quorum sensing and bacterial biofilms // Nat. Product Reports. 2010. Vol. 27. P. 343–369.
- Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. 2002. Vol. 15. P. 167–193.
- Gossas, T. Characterization of Ca²⁺ interaction with matrix metalloproteinase-12: implications for matrix metalloproteinase regulation / T. Gossas, U.H. Danielson // Biochem. J. 2006. Vol. 3. P. 393–398.
- Götz, F. Staphylococcus and biofilms // Mol. Microbiol. 2002. Vol. 43. P. 1367–1378.
- Habash, M. Microbial Biofilms: their development and significance for medical device-related infections / M. Habash, G. Reid // J. Clin. Pharmacol. 1999. Vol. 39. P. 887–898.

- Jackson, D. W. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation / D.W. Jackson, J.W. Siemecka, T. Romeo // J. Bacteriol. 2002. Vol. 12. P. 3406–3410.
- McCoy, W.F. Observations of fouling biofilm formation / W.F. McCoy, J.D. Bryers, J. Robbins, J.W. Costerton // Can. J. Microbiol. 1981. Vol. 27. P. 910–917.
- Mikhailova, A.G. Effect of calcium ions on enteropeptidase catalysis / A.G. Mikhailova, V.V. Likhareva, I.A. Prudchenko, L.D. Rumsh // Biochemistry (Mosc). 2005. Vol. 10. P. 1129–1135.
- Watnick, P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // J. Bacteriol. 2000. Vol. 182. P. 2675–2679.
- Ye, Q. Z. Metalloform-selective inhibitors of *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and X-ray structure of a Mn(II)-form enzyme complexed with an inhibitor / Q.Z. Ye, S.X. Xie, M. Huang [et al.] // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 43. P. 13940–13941.

Поступила в редакцию 15.03.2010

Sensitivity assay for the processes of *Staphylococcus epidermidis* 33 biofilm formation with respect to several environmental factors

V. P. Korobov, candidate of medicine, associate professor, head of laboratory

Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; biodin@psu.ru; (342)2396489
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; info@iegm.ru

L. M. Lemkina, candidate of medicine, senior scientist

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; info@iegm.ru

V. I. Monakhov, student

Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; biodin@psu.ru

The processes of biofilm formation by bacteria *Staphylococcus epidermidis* 33 on the surfaces of glass, medical catheters, and microbiological plates were examined. It is shown that the dynamics of film biomass accumulation on LB enriched medium reflects in many respects the kinetics of planktonic bacterial culture growth. Most pronounced biofilm formation occurs on the surfaces of catheters and plates with hydrophobic properties. Maximum level of film biomass could be detected under the cultivation in neutral pH zone. However, the intensive growth of biofilms is also observed under the elevated acidity (pH 4.0), as well as in weak alkaline zone (pH 8.0). The introduction of glucose (1.0%), galactose (0.1–1.0%), and mannose (0.5–1.0%) and the ions of Mg^{2+} , Ca^{2+} , or Mn^{2+} in concentrations of 0.05–12.5 mM into the culture medium resulted in significant inhibition of biofilm formation. Results evidence for marked alteration in bacterial metabolism of *S. epidermidis*, as well as for its regulation; these apparently contribute to biofilm formation by these bacteria upon their colonization of different surfaces.

Key words: biofilms; *Staphylococcus epidermidis*; surface colonization; cultivation conditions; hydrophobicity.

Коробов Владимир Павлович, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией
ГОУВПО «Пермский государственный университет»
ГУ РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»

Лемкина Лариса Марковна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ГУ РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»

Монахов Вадим Игоревич, студент
ГОУВПО «Пермский государственный университет»