



УДК 579.222

Роль глюкозы в формировании биоплёнок бактериями *Escherichia coli* и *Pectobacterium carotovorum*

А. А. Ульданова, А. Л. Турская, А. В. Степанов, Ю. А. Маркова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: Uldanova_anna@mail.ru

Аннотация. Изучены процессы формирования биоплёнок бактериями *Escherichia coli* (штамм *XL1-Blue*) и *Pectobacterium carotovorum* (штамм *B-1247*) на поверхности лунок полистироловых планшетов. Показано, что динамика образования биоплёнки при использовании в качестве среды забуференного физиологического раствора с содержанием 0,1%-ного и 0,5%-ного раствора глюкозы зависит не от исходного количества бактериальных клеток, а от состава среды, в частности, содержания сахаров. Введение в среду культивирования глюкозы в более высоких концентрациях способствует процессу биоплёнкообразования. Результаты исследований свидетельствуют о том, что бактерии, обитающие в разных экологических нишах (*P. carotovorum* – фитопатоген с некротрофным типом питания, а *E. coli* – условно-патогенный по отношению к человеку микроорганизм, широко распространённый в окружающей среде), обладают, по-видимому, схожими механизмами биоплёнкообразования.

Ключевые слова: биоплёнки, *Escherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*, колонизация поверхности, условия культивирования.

Введение

Большинство бактерий в природных экосистемах существуют в виде биоплёнок. Биоплёнка – это структурированное сообщество бактериальных клеток, имеющих изменённый фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфичных генов, заключённое в полимерный матрикс и прикреплённое к инертным или живым поверхностям. При этом сами бактерии составляют лишь 5–35 % массы биоплёнки, основную же долю составляет межбактериальный матрикс, который вырабатывается сразу после адгезии и является основным фактором устойчивости биоплёнок [2; 4; 12]. Он сформирован из липополисахаридов, протеогликанов, гликопротеидов, эндополисахаридов, аналогичных веществ клеточной стенки, гликокаликса и капсул бактерий. Биоплёнки бактерий (маты) были открыты сравнительно давно [10], однако лишь в последнее десятилетие исследование этих микробиологических объектов приобрело систематический характер. Изменение биологических свойств бактерий в биоплёнках имеет критическое значение, поскольку приводит к усилению их патогенности за счёт устойчивости к действию антибиотиков, невосприимчивости к специфическим и неспецифическим факторам иммунной защиты колонизированного макро-

организма [3; 13]. Пространственная организация бактериальных биоплёнок крайне вариabельна: они наблюдаются на твёрдых поверхностях как пелликулы или в массе водной среды как флоккуляты или гранулы [9].

Изучение механизмов формирования, структуры, взаимоотношений биоплёнок с окружающей средой и организмом-хозяином открывает новые возможности для профилактики и лечения целого ряда заболеваний. Они оказывают значительное влияние на этиологию и патогенез многих острых и, в основном, хронических бактериальных инфекций человека. К ним относятся инфекции мочевых путей (*Escherichia coli* и др.), инфекции среднего уха (*Haemophilus influenzae*), муковисцидоз, кистозный фиброз (*Pseudomonas aeruginosa*), инфекционный эндокардит, инфекции протезированных клапанов, катетер-ассоциированные инфекции кровотока (коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки, грибы рода *Candida*) и стоматологические инфекции (кариес, пародонтит, гингивит). Согласно опубликованным данным, частота обусловленных биоплёнкой инфекций составляет 65–80 %, свыше 60 % внутрибольничных инфекций вызвано микроорганизмами, находящимися в биоплёнках. Так, инфекционные эндокардиты, кератиты и другие инфекции, развивающиеся

на катетерах, вызваны контаминацией биоплёнками медицинских имплантантов. Очень важно, что многие патогены, такие как *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria*, *Campylobacter*, образовав биоплёнку, существуют на поверхности пищевых продуктов или на поверхности оборудования для их хранения [7].

Поражение растений бактериями, способными образовывать биопленки, наносит значительный урон сельскому хозяйству. Один из важных представителей фитопатогенов, *Pectobacterium carotovorum*, обладает набором пектолитических ферментов, образуя мягкие гнили у разных видов растений. Образование биоплёнок *P. carotovorum* может выступать как фактор вирулентности и выживаемости во внешней среде и, соответственно, вызывать развитие болезней у растений. Изучение динамики образования биоплёнок в различных условиях окружающей среды даёт объективное представление о механизмах взаимодействия бактерий с растительными организмами и является перспективным направлением изучения в области фитоиммунологии. С изучением условий формирования биоплёнок в дальнейшем становится возможной разработка методов защиты растений для повышения их устойчивости [5;11].

Цель настоящей работы – изучение влияния состава среды культивирования на формирование биоплёнок бактериями *P. carotovorum* и *E. coli*.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовались штаммы бактерий *E. coli* (штамм XL-Blue) и *P. carotovorum* (штамм B-1247), которые были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г. В. Скрыбина (г. Пушкино). Формирование биоплёнок проводили на 96-луночных планшетах (полистирол, США, Германия), для этого использовался планшетный спектрофотометр (Biograd, США). Для постановки метода использовались чистые культуры бактерий, инкубированные в течение 48 ч на ГМФ-агаре (НИЦ фармакотерапий, Санкт-Петербург) при 26 °С.

Оптимальное разведение биомассы в забуференном физиологическом растворе подбирали опытным путём. В 4 стерильных бюкса ёмкостью 5 мл вносили по 5 мл испытуемой среды и добавляли 500 мкл смывой со скошенного

агара культуры. Далее из каждого бюкса с разведением 10, 100, 1000 и 10 000 раз вносили по 150 мкл разведённой суспензии культуры в планшет. В эксперименте использовался забуференный физиологический раствор с содержанием 0,1%-ного и 0,5%-ного растворов глюкозы.

Биоплёнки выращивали в термостате при 26 °С в статических условиях без дополнительной аэрации. После инкубации планктонная фаза популяции бактерий удалялась вместе с питательной средой, образовавшуюся биоплёнку выявляли с помощью окрашивания 1%-ным раствором кристаллического фиолетового. Учёт биомассы плёнок осуществляли путём измерения количества связавшегося с ними красителя. Для экстракции краски из плёнки добавляли 96%-ный этанол и определяли оптическую плотность (ОП) раствора при длине волны 495 нм. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени плёнокообразования. Количественным выражением степени служили полученные с помощью спектрофотометра значения ОП [6], которые определяли после разведения и внесения в лунки, через сутки после инкубации и после окрашивания биоплёнок.

Эксперимент проводили четырёхкратно для *P. carotovorum* и шестикратно для *E. coli*, в каждом эксперименте использовались 5 планшетов по 30 повторностей в каждом.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовалась программа Excel из пакета MS Office 2010, значимость результатов определяли при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно результатам эксперимента (табл. 1), показатели оптической плотности среды исходной концентрации и концентрации через двое суток культивирования бактерий были прямо пропорциональны степени разведения. При этом, несмотря на отсутствие значимой разницы в показателях плотности бактериальных клеток, культивируемых в разных средах, плотность биоплёнок в забуференном физиологическом растворе с добавлением глюкозы (в частности, 0,5%-ного раствора), была значимо выше при любых концентрациях бактериальных клеток.

Сходные результаты получены для биоплёнок, сформированных *E. coli* (табл. 2).

Таблица 1

Оптическая плотность культур *E. coli* (штамм *XL-Blue*), инкубируемых на забуференном физиологическом растворе разной концентрации с различным содержанием глюкозы

Среда	Степень разведения	Оптическая плотность		
		До начала инкубации	После инкубации	Биопленки
Забуференный физиологический раствор	1:10	0,109±0,006	0,069±0,006	0,216±0,035
	1:100	0,008±0,002	0,003±0,002	0,002±0,080
	1:1000	0,010±0,003	0,001±0,004	0,0
	1:10000	0,001±0,004	0,0	0,0
Забуференный физиологический раствор + 0,1 % глюкозы	1:10	0,104±0,005	0,065±0,009	0,233±0,025
	1:100	0,016±0,006	0,011±0,004	0,038±0,013
	1:1000	0,007±0,006	0,004±0,003	0,026±0,016
	1:10000	0,003±0,003	0,002±0,003	0,011±0,009
Забуференный физиологический раствор + 0,5 % глюкозы	1:10	0,097±0,007	0,071±0,007	0,179±0,017
	1:100	0,009±0,004	0,016±0,002	0,052±0,011
	1:1000	0,001±0,004	0,009±0,002	0,044±0,013*
	1:10000	0,004±0,004	0,011±0,002	0,036±0,013*

Таблица 2

Оптическая плотность культур *P. carotovorum* (штамм В-1247), инкубируемых на забуференном физиологическом растворе разной концентрации с различным содержанием глюкозы

Среда	Степень разведения	Оптическая плотность		
		До инкубации	После инкубации	Биопленки
Забуференный физиологический раствор	1:10	0,134±0,050	0,100±0,013	0,035±0,018
	1:100	0,008±0,020	0,004±0,010	0,0
	1:1000	0,0	0,0	0,0
	1:10000	0,0	0,0	0,0
Забуференный физиологический раствор + 0,1 % глюкозы	1:10	0,108±0,008	0,079±0,009	0,168±0,020*
	1:100	0,008±0,003	0,005±0,002	0,046±0,015
	1:1000	0,0	0,0	0,015±0,015
	1:10000	0,0	0,0	0,017±0,020
Забуференный физиологический раствор + 0,5 % глюкозы	1:10	0,139±0,006	0,126±0,009	0,219±0,023*
	1:100	0,034±0,050	0,015±0,002	0,129±0,029*
	1:1000	0,027±0,003	0,008±0,002	0,075±0,027
	1:10000	0,033±0,003	0,011±0,002	0,094±0,032*

Всё вышеизложенное свидетельствует о том, что обогащение голодной питательной среды глюкозой благоприятный и более существенный фактор для формирования биоплёнок, чем концентрация бактериальных клеток.

Как показывают результаты эксперимента, формирование биоплёнок в лунках полистироловых планшетов в забуференном физиологическом растворе происходит в течение быстрого времени. Выраженные гидрофобные свойства полимерных планшетов, по всей видимости, не затрудняют первые этапы формирования бактериальных плёнок – «приклеивания» бактерий к поверхности и, как следствие, ускоряют процесс включения сигнальной системы «quorum – sensing» [8].

Имеются факты, свидетельствующие о том, что внеклеточный матрикс биоплёнок бактерий

включает все основные полимеры бактериальных клеток – высокомолекулярные полисахариды, липиды, гликолипиды, гликопротеины, и экстрацеллюлярные ДНК, которые выполняют в биоплёнке структурную и функциональную роль [1]. Поэтому особый интерес представляет изучение возможных зависимостей накопления биомассы плёнок от содержания в среде роста моносахаридов как источников энергии, так и пластического материала.

При внесении в среду глюкозы, которая является непосредственным предшественником синтеза бактериями полиуглеводных компонентов матрикса биоплёнок, были получены следующие результаты. Введение при культивировании в течение 48 ч в бедную по составу среду забуференного физиологического раствора глюкозы в небольших концентрациях

(0,1 % и 0,5 %) способствовало процессу плёнокообразования у обеих культур даже при низких степенях разведения. Этому, предположительно, может способствовать и включение сигнальной системы «quorum-sensing» [8].

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что состав среды забуференного физиологического раствора недостаточен для роста и формирования биоплёнок исследуемых штаммов. Добавление в среду глюкозы, особенно в концентрации 0,5 %, обеспечивает потребности систем биосинтеза углеводных компонентов биоплёнок *E. coli* и *P. carotovorum*.

Заключение

Динамика формирования биоплёнок бактериями *Pectobacterium carotovorum* и *Escherichia coli*, повидимому, во многом определяется физико-химическими свойствами поверхности субстрата, на котором происходит адгезия бактерий. Кроме того, процесс биоплёнокообразования определяется изменениями метаболизма бактериальных клеток и уровнем активности внеклеточных гидролитических систем, в частности, гидрофильностью и гидрофобностью субстрата.

Публикация статьи осуществлена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 13-04-06068-г.

Литература

1. Изучение структуры экзополимерного комплекса биоплёнки коррозионно-активных бактерий / М. А. Борецкая [и др.] // Биотехнология. – 2012. – Т. 5. – С. 78–84.
2. Коробов В. П. Анализ чувствительности процессов формирования биоплёнок *Staphylococcus epidermidis* 33 к некоторым факторам внешней среды / В. П. Коробов, Л. М. Лемкина, В. И. Монахов //

Вестн. Перм. ун-та. Биология. – 2010. – Вып. 1. – С. 59–63.

3. Образование биоплёнок – пример «социального» поведения бактерий / Ю. М. Романова [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – С. 556–561.
4. Сидоренко С. В. Роль бактериальных биоплёнок в патологии человека / С. В. Сидоренко // Инфекции в хирургии. – 2010. – Т. 2. – С. 16–21.
5. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина / Е. А. Николайчик [и др.] // Тр. БГУ. – 2009. – Т. 4, ч. 1. – С. 1–7.
6. Формирование биоплёнок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderria cerasia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик / И. А. Шагинян [и др.] // Журн. микробиологии. – 2007. – № 1. – С. 3–9.
7. Чернявский В. К. Бактериальные биоплёнки и инфекция (лекция) / Харьковская медицинская академия постдипломного образования // Annals of Mechnicov Institute. – 2013. – № 1. – С. 86–90.
8. Dickschat J. S. Quorum sensing and bacterial biofilms // Nat. Product Reports. – 2010. – Vol. 27. – P. 343–369.
9. Morris C. E. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganism / C. E. Morris, J. Monier, M. Jacques // J. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63. – P. 1570–1576.
10. Observations of fouling biofilm formation / W. F. McCoy [et al.] // Can. J. Microbiol. – 1981. – Vol. 27. – P. 910–917.
11. Quorum sensing and expression of virulence in *Pectobacteria* / L. Pöllumaa [et al.] // Sensors. – 2012. – Vol. 12. – P. 3327–3349.
12. Tetz V. V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies / V. V. Tetz // Med. Microbiol. Lett. – 1996. – Vol. 5. – P. 426–36.
13. Watnick P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – P. 2675–679.

Role of glucose in the formation of biofilms with different bacterial species *Escherichia coli* and *Pectobacterium carotovorum*

A. A. Uldanova, A. L. Turskaya, A. V. Stepanov, Y. A. Markova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

Abstract. Biofilm formation with bacteria *Escherichia coli* (strain XL1-Blue) and *Pectobacterium carotovorum* (strain B-1247) on the surface of polystyrene plates have been studied. The dynamics of using the accumulation of biofilm tablet method for buffered saline, buffered saline, with the content of 0,1 % glucose and 0,5 % glucose solution, was independent of the original amount of bacterial cells, depending on the composition of the medium, in particular, making sugars. Introducing into the culture medium in higher glucose concentration promotes process biofilm formation that was recorded on the surface of polystyrene plates. Results indicate that the mechanism of biofilm formation is similar to the bacteria that live in different ecological niches (*Pectobacterium carotovorum* strain B-1247 is a necrotrophic phytopathogen type of nutrient metabolism, and *Escherichia coli* strain XL1-Blue – it is conditional-pathogenic microorganism for human, widespread in the environment), but they have apparently similar mechanisms of biofilm formation.

Keywords: biofilm, *Escherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*, colonization of the surface, conditions of cultivation.

Ульданова Анна Алексеевна
аспирант
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел. (3952)42-50-09, факс (3952) 51-07-54,
E-mail: Uldanova_anna@mail.ru

Uldanova Anna Alekseevna
Doctoral Student
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS
132 Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952)42-50-09, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: Uldanova_anna@mail.ru

Турская Анна Леонидовна
кандидат биологических наук, научный сотрудник
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова 132
тел. (3952)42-50-09, факс (3952) 51-07-54,
E-mail: turskaya-anna@mail.ru

Turskaya Anna Leonidovna
Ph. D. in Biology, Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-50-09, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: turskaya-anna@mail.ru

Степанов Алексей Владимирович
кандидат биологических наук, научный сотрудник
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел. (3952) 42-46-59, факс (3952) 51-07-54
E-mail: stepanov@sifibr.irk.ru.

Stepanov Alexey Vladimirovich
Ph. D. in Biology, Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS
132 Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-46-59, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: stepanov@sifibr.irk.ru.

Маркова Юлия Александровна
доктор биологических наук, старший
научный сотрудник
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова 132
тел. (3952) 42-50-09; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: juliam06@mail.ru

Markova Julia Aleksandrovna
Dr. Sci. of Biology, Head of the Laboratory
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-50-09, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: juliam06@mail.ru