

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ СЕРОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ СО СПОСОБНОСТЬЮ К БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЮ

В статье представлены материалы о вариабельности 45 штаммов *Escherichia coli* от пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями урогенитального тракта и желчевыводящих путей по серорезистентности, интегральным физико-химическим параметрам (гидрофобность, электрокинетический потенциал – z-потенциал) и способности к формированию биопленок. Установлено, что биопленкообразующие культуры и «биопленочная» фракция эшерихий менее устойчивы к бактерицидной активности сыворотки и более гидрофобны, чем изоляты *E. coli*, не формирующие биопленки, и клетки из «планктонной» фракции.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, биопленки, планктонные клетки, серорезистентность, гидрофобность, z-потенциал.

Введение

Способность бактерий образовывать биопленки многими исследователями рассматривается как важное свойство, обеспечивающее выживание микроорганизмов в неблагоприятных условиях (высушивание, повышенная инсоляция и др.), а также при их контакте с антибиотиками и дезинфектантами [1-3]. Считается, что формирование микроорганизмами биопленок имеет отношение к патогенезу многих инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе, ассоциированных с катетерами и имплантатами [4, 5]. Вместе с тем данные о влиянии биопленкообразования на устойчивость бактерий, в частности *Escherichia coli* как возбудителей внекишечных эшерихиозов (воспалительная патология моче- и желчевыводящих путей, сепсис, нозокомиальные инфекции и др.) [6, 7], к различным эффекторам иммунитета макроорганизма пока немногочисленны и противоречивы, что определяет актуальность исследований, направленных на изучение взаимосвязи между указанными свойствами.

Целью настоящей работы явился анализ взаимосвязи серорезистентности и интегральных физико-химических характеристик (гидрофобность, электрокинетический потенциал) эшерихий, выделенных при инфекционно-воспалительных заболеваниях урогенитального тракта и желчевыводящих путей, с их способностью образовывать биопленки.

Материалы и методы исследования

Исследования выполнены на 45 штаммах *Escherichia coli* из коллекции ИКиВС УрО РАН, выделенных из урогенитального тракта и мочи

у больных с простатитом, сальпингоофоритом, пиелонефритом и циститом, а также из желчи от пациентов с инфекционно-воспалительной патологией желчевыводящих путей (гнойный холангит, холецистит). Идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам с использованием наборов «Enterotest I и II» (LaChema, Чехия) [8].

Образование биопленок эшерихиями изучали с помощью «планшетного метода» [9], путем выращивания штаммов *E. coli* в 150 мкл мясопептонного бульона (МПБ) в 96-луночной полистироловой планшете в течение 24 ч при 37°С, удаления из лунок планктонных клеток, окрашивания биопленок 1% раствором кристаллвиолета, промывания лунок дистиллированной водой, внесения в них 96% этанола и замера с помощью фотометра Multiscan ascent (Thermo Electron Co., China) оптической плотности (OD) надосадочной жидкости при длине волны (λ) 540 нм. Интенсивность окрашивания соответствовала степени пленкообразования исследуемых культур эшерихий.

При определении серорезистентности, гидрофобности и электрокинетического потенциала эшерихий использовали суточные агаровые культуры *E. coli*, а также клетки из разных фракций бульонных культур эшерихий, инкубированных в лунках полистироловой планшеты. Планктонную фракцию клеток *E. coli* отбирали путем изъятия из лунок 100 мкл надосадочной части МПБ, содержащей взвешенные бактерии; биопленочную фракцию клеток эшерихий получали путем добавления к осадку 100

мкл 15М раствора NaCl и механической дезинтеграции пленок. Обе фракции клеток трижды отмывали 15М раствором NaCl (30 мин, 3000 об/мин) и стандартизовали по OD на фотоэлектроколориметре КФК-2 (Россия) при $\lambda=540$ нм.

Серорезистентность эшерихий оценивалась по методике [10] с использованием в опыте 50% сыворотки крови человека (пул от 20 здоровых доноров), а в контроле – 15М раствора NaCl путем замера с помощью фотометра Multiscan ascent (Thermo Electron Co., China) оптической плотности (OD) опытных и контрольных взвесей при $\lambda=540$ нм и расчета индекса резистентности к бактерицидной активности сыворотки (И-РБАС,%) по следующей формуле: $И-РБАС = OD_0 / OD_k * 100$, где OD_0 и OD_k – оптические плотности опытных и контрольных взвесей бактерий соответственно.

Для оценки степени гидрофобности эшерихий использовали метод разделения взвеси клеток *E. coli* в двухфазной системе «жидкость-жидкость» с несмешивающимися водными фазами в 0,15М растворе NaCl, обогащенными полиэтиленгликолем (PEG 6000; с конечной концентрацией 4,5%) и декстраном (Т500; с конечной концентрацией 6,2%), что обеспечивало средний уровень межфазного поверхностного натяжения [11, 12]. Эмульгирование смеси производили непосредственно после добавления в нее бактерий путем интенсивного встряхивания на вортексе (2000 об/мин) в течение 120 сек при комнатной температуре. О гидрофобности бактерий судили по показателю гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ), который рассчитывали по формуле: $ГЛБ = \lg(OD_{PEG} / OD_{Dextran})$, где OD_{PEG} и $OD_{Dextran}$ – оптические плотности верх-

ней (гидрофобной, обогащенной PEG 6000) фазы и нижней (гидрофильной, обогащенной декстраном Т500) фазы соответственно, замеренных с помощью фотометра Multiscan ascent (Thermo Electron Co., China) при $\lambda=540$ нм.

Измерение электрокинетического потенциала (z -потенциала, mV) клеток *E. coli* осуществляли амплитудно-частотным методом [13] с использованием Дзетометра-1М (Россия) в обычном режиме его работы (напряжение – 10 В, частота – 0,2 Гц) путем измерения амплитуды колебаний 50 бактериальных клеток в микроэлектрофоретической камере (размеры: 22x22 мм, высота 0,2 мм) и вычисления средних значений z -потенциала для конкретного данного штамма по аппроксимированной формуле Смолуховского [14].

Обработку данных осуществляли методами вариационной статистики и корреляционного анализа [15].

Результаты исследования

Изученные штаммы *E. coli* оказались вариabельными по способности образовывать биопленки. Меньшая часть (35,6±7,2%) культур эшерихий не образовывала биопленки, а 64,4±7,2% изолятов *E. coli* были способны к биопленкообразованию ($OD > 0,2$). Причем среди последних биопленкообразующих изолятов *E. coli* имелись культуры как со слабой ($OD < 0,6$), так и с высокой ($OD > 0,6$) экспрессией данного признака (42,2±7,4 и 22,2±6,3% штаммов соответственно).

Сопоставление выраженности других характеристик (серорезистентность, степень гидрофобности и величина z -потенциала) у эшерихий с учетом их способности к биопленкообразованию выявило ряд достоверных ($p < 0,05$) межгрупповых отличий *E. coli* (таблица).

Таблица. Серорезистентность и физико-химические свойства эшерихий с учетом их способности к биопленкообразованию

Характеристики бактерий	Штаммы <i>E. coli</i>		Всего (n=45)
	Не образующие биопленки (n=16)	Образующие биопленки (n=29)	
И-РБАС, %	$\frac{60,0-132,4}{104,1 \pm 4,5}$	$\frac{4,3-130,6}{76,6 \pm 7,5^*}$	$\frac{4,3-132,4}{86,4 \pm 5,4}$
ГЛБ, усл. ед.	$\frac{-2,13 \dots +0,38}{-0,79 \pm 0,24}$	$\frac{-1,71 \dots +1,93}{-0,39 \pm 0,15^*}$	$\frac{-2,13 \dots +1,93}{-0,53 \pm 0,13}$
z -потенциал, mV	$\frac{-12,5 \dots -29,9}{18,9 \pm 1,2}$	$\frac{-10,5 \dots -33,6}{-18,5 \pm 1,0}$	$\frac{-10,5 \dots -33,6}{-18,7 \pm 0,8}$

Примечание: в числителе – диапазон варьирования признака; в знаменателе – средние значения; И-РБАС – индекс резистентности к бактерицидной активности сыворотки; ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс; * – достоверные отличия между группами ($p < 0,05$)

Так, эшерихии, склонные к биопленкообразованию, были менее устойчивы к бактерицидной активности сыворотки (И-РБАС=76,6±7,5%) и обладали более высокой степенью гидрофобности (ГЛБ=-0,39±0,15 усл. ед.), чем изоляты *E. coli*, не образующие биопленки (И-РБАС=104,1±4,5% и ГЛБ=-0,79±0,24 усл. ед. соответственно), но практически не отличались друг от друга по величине z-потенциала. При этом минимальный уровень серорезистентности (И-РБАС=72,4±9,1%) демонстрировали изоляты эшерихий, образующие «толстые» биопленки (OD>0,6), а гидрофобность клеток «планктонных» фракций биопленкообразующих штаммов (ГЛБ=-0,68±0,08) была сопоставима с гидрофобностью эшерихий, не обладающих способностью образовывать биопленки (p>0,05).

Результаты корреляционного анализа также указывали на наличие у кишечных палочек достоверных (p<0,05) взаимосвязей их способности образовывать биопленки с уровнем серорезистентности (r=-0,36) и ГЛБ (r=0,31), а кроме того на обратную зависимость уровня устойчивости эшерихий к бактерицидной активности сыворотки от степени их гидрофобности (r=-0,46).

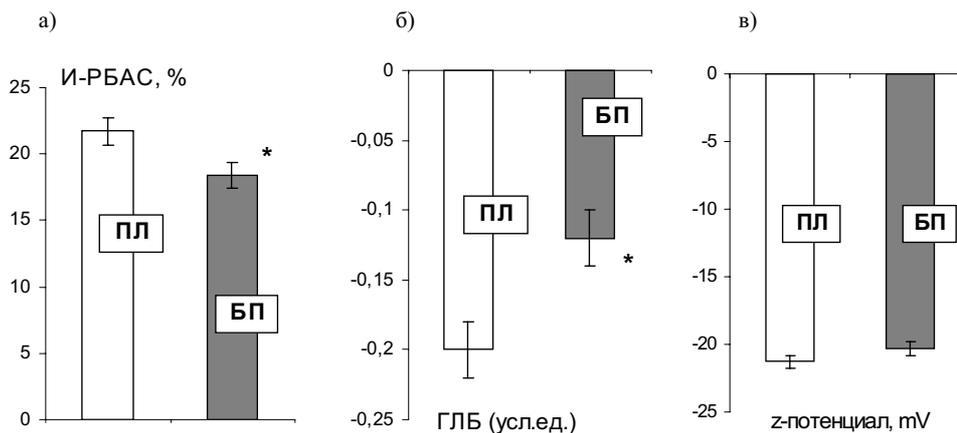
Для экспериментального подтверждения взаимосвязи биопленкообразования кишечных палочек с их серорезистентностью и физико-химическими свойствами на 9 штаммах *E. coli*, формирующих выраженные биопленки (OD≥0,6), проведено определение указанных

свойств у клеток эшерихий, препаративно отобранных из планктонной и биопленочной фракций (рисунок).

Установлено, что «планктонные» клетки *E. coli* в сравнении с «биопленочными» были в 1,2 раза устойчивее к бактерицидной активности сыворотки крови и в 1,7 раза более гидрофильны (p<0,05), но достоверно не отличались по z-потенциалу. Кроме того, в специальной серии опытов с использованием этих же штаммов *E. coli* показано, что механическая дезинтеграция биопленок практически не изменяла уровень серорезистентности эшерихий.

Обсуждение

При развитии многих эндогенных бактериальных инфекций, включая внекишечные эшерихиозы, ключевыми этапами патогенеза являются гематогенная диссеминация микроорганизмов и колонизация ими тканей инфицированных органов [7]. Реализация указанных процессов критически зависит от способности возбудителей выживать при контакте с эффекторами иммунитета (в частности, системой комплемента сыворотки крови) и адгезироваться на поверхности клеток макроорганизма (в том числе, с последующим образованием микроколоний и биопленок) [6, 16, 17]. В этой связи понятно повышенное внимание к указанным характеристикам эшерихий как приоритетных возбудителей инфекционно-воспалительных



Обозначения: ПЛ – клетки планктонной фракции; БП – клетки биопленочной фракции; * – достоверные отличия между группами (p<0,05)

Рисунок. Характеристика клеточных фракций *E. coli* по серорезистентности (а); гидрофобности (б) и z-потенциалу (в)

процессов в урогенитальном тракте и желчевыводящей системе.

Приведенные в работе данные свидетельствуют не только о вариабельности *E. coli* по серорезистентности, интегральным физико-химическим характеристикам (гидрофобность, z -потенциал) и способности к биопленкообразованию, что отражает их фенотипическое разнообразие и отчасти может быть обусловлено коллекционным хранением бактериальных культур, но и об определенных взаимосвязях между этими признаками, представляющих интерес в нескольких аспектах. Так, еще раз подтверждена обратная зависимость уровня устойчивости эшерихий к комплементопосредованной бактерицидной активности сыворотки крови от степени гидрофобности *E. coli*, указывающая на существенное значение состояния гидратированности клеточной стенки грамотрицательных бактерий в детерминации их серорезистентности [12]. Однако другой интегральный физико-химический показатель (z -потенциал) эшерихий слабо влиял как на их устойчивость к сыворотке, так и на их склонность к формированию биопленок, хотя считается, что образующийся при этом экзополисахаридный матрикс не только сообщает микроколонию дополнительный отрицательный заряд, но и ограждает бактерии от губительного действия ряда антимикробных веществ [4, 5]. В то же время выявлена обратная корреляционная связь серорезистентности эшерихий с их способностью образовывать биопленки, которая, на

первый взгляд, может показаться парадоксальной, поскольку биопленкообразование «традиционно» связывают с повышенной устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам, волюнтаристически перенося эти представления на защиту бактерий от других антимикробных веществ, в том числе, выполняющих функцию эффекторов иммунитета макроорганизма [2, 3]. Полученные результаты заставляют усомниться в правомерности такой безусловной экстраполяции, не учитывающей видовую принадлежность и источник выделения бактерий, а также особенности механизмов взаимодействия разных эффекторных систем с ними. Отсюда очевидна необходимость дальнейшего изучения роли биопленкообразования у патогенных и потенциально патогенных микроорганизмов при их контакте с конкретными гуморальными эффекторами иммунитета, что позволит объективно оценить вклад данного свойства возбудителей в патогенез инфекционно-воспалительных заболеваний разной этиологии. В этом смысле, обнаруженный более высокий уровень серорезистентности у «планктонных» *E. coli*, в сравнении с «биопленочными» эшерихиями, представляется патогенетически вполне целесообразным, так как именно клетки, не ассоциированные тесно с биопленкой возбудителей, участвуют в гематогенной диссеминации внутри макроорганизма, при которой немигнута их встреча с системой комплемента сыворотки крови [6, 7].

21.06.2011

Список литературы:

1. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999. 284: 1318–1322.
2. Oie S., Huang Y., Kamiya A., Konishi H., and Nakazawa T.. Efficacy of disinfectants against biofilm cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 1996. *Microbios*. 85: 223–230.
3. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001. 4: 999–1007.
4. Davey M.E., O'Toole G.A.. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. and Molec. Biol. Rev.* 2000. 12: 847–867.
5. Ong C.Y., Ulett G.C., Mabbett A. N. et al.. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *E. coli* reveals a role in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2008. 3: 1054–1063.
6. Гриценко В.А., Брудастов Ю.А., Журлов О.С. Серорезистентность энтеробактерий, выделенных из различных источников. *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1999. 3: 3-6.
7. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных инфекций. *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2009. 4: 66-71.
8. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/ Под ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. 464 с.
9. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 2000, 54: 49-79.
10. Бухарин О.В., Брудастов Ю.А., Гриценко В.А., Дерябин Д.Г. Роль способности бактерий к инаktivации факторов естественной противоиnфекционной резистентности в их устойчивости к бактерицидному действию крови (сыворотки крови). *Бюлл. экпер. биол. и медиц.* 1996. 2: 174-176.
11. Magnusson K.E., Stendahl O., Tagesson C., Edebo L., Johansson G. The tendency of smooth and rough *Salmonella typhimurium* bacteria and lipopolysaccharide to hydrophobic and ionic interaction, as studied in aqueous polymer two-phase systems. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B)*. 1977. 85: 212-218.
12. Брудастов Ю.А., Гриценко В.А., Журлов О.С., Чертков К.Л. Характеристика гидрофобных свойств бактерий при их взаимодействии с сывороткой крови. *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1997. 4: 73-77.

13. Soni K.A., Balasubramanian A. K., Beskok A., Pillai S. D. Zeta Potential of Selected Bacteria in Drinking Water When Dead, Starved, or Exposed to Minimal and Rich Culture Media. *Curr. Microbiol.* 2008. 56: 93–97.
14. Журлов О.С., Гриценко В.А., Брудастов Ю.А. Влияние температуры культивирования на физиологические и физико-химические свойства *Escherichia coli* K12. *Вестник Оренбургского государственного университета.* 2009. 12: 106-110.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
16. Ofek I., Doyle R.J. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman Hall, 1994. Inc., New York, N.Y.
17. Pratt L.A., Kolter R.. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 1998. 30: 285–293.

Работа выполнена в рамках совместного проекта организаций УрО, СО и ДВО РАН

Сведения об авторах:

Гриценко Виктор Александрович, заведующий лабораторией клеточного симбиоза Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (г. Оренбург), доктор медицинских наук, профессор

Журлов Олег Сергеевич, старший научный сотрудник лаборатории клеточного симбиоза Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (г. Оренбург), кандидат медицинских наук

Андрейчев Виталий Васильевич, заочный аспирант Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (г. Оренбург), врач-дерматовенеролог ММУЗ Муниципальная городская клиническая больница им. Н.И. Пирогова, г. Оренбург 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел.: (3532) 770512, e-mail: vag59@mail.ru

UDC 579.22

Gritsenko V.A., Zhurlov O.S., Andreychev V.V.

The Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS, Orenburg

ANALYSIS OF INTERCONNECTION OF SERUMRESISTENCE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ESCHERICHIA COLI WITH THEIR ABILITY TO FORM BIOFILMS

The article includes materials about variability of 45 strains *Escherichia coli* from patients with infectious-inflammatory diseases of an urogenital tract and biliary ways to serumresistence, integral physico-chemical properties (hydrophobicity, electrokinetic potential – z-potential) and ability to form biofilms. Bacterial isolates forming biofilms and «biofilm» fraction of *E. coli* are less resistant to bactericidal activity of serum and more hydrophobic, than isolates *E. coli* not forming biofilms, and cells from «planktonic» fraction was established.

Key words: *Escherichia coli*, biofilms, planktonic cells, serumresistence, hydrophobicity, z-potential.