

МІКРОБІОЛОГІЯ

© Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Шевченко Т. М., Вінніков А. І.

УДК 579. 61:616-078

Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Шевченко Т. М., Вінніков А. І.

ВПЛИВ ФАКТОРІВ СЕРЕДОВИЩА НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

(м. Дніпропетровськ)

Дана робота є фрагментом НДР «Теоретичні та практичні основи життєдіяльності мікробіоценозів, форм взаємовідносин з тваринами і рослинами», № держ. реєстрації 0112U000192, Д/б тема № 1-262-12.

Вступ. Біоплівки умовно-патогенних бактерій широко розповсюджені у навколишньому середовищі, а саме в організмі людини та тварин. Відомо, що бактерії, які входять до складу біоплівок більш стійкі до впливу різних агресивних факторів, таких як температура, показники рН тощо з одного боку, та до антибіотиків, які використовують у лікуванні інфекцій – з іншого боку [1, 3, 2].

На процес формування біоплівок та їх властивості впливають фактори навколишнього середовища і властивості клітин мікроорганізмів. Найбільш важливими факторами середовища існування є значення рН, концентрація солей, осмолярність, парціальний тиск, доступність поживних речовин, а також гідрофобність поверхні розподілу фаз, сила та тип руху рідини відносно цієї поверхні. Крім того, на бактеріальну адгезію впливають зміни в концентраціях кисню, а також деякі отрути та ультрафіолетове випромінювання. Вважається, що дія різних негативних факторів позитивно впливає на процеси біоплівкоутворення [1, 9, 10].

Одними з найбільш відомих, формуючих біоплівку бактерій є стафілококи [3, 6]. Серед них провідне місце за здатністю до біоплівкоутворення та у спричинюванні інфекцій, що пов'язані з формуванням біоплівок займає *S. epidermidis* [2, 11].

Метою дослідження було вивчити вплив різних значень кислотності (рН 4,0-8,0) та концентрацій (0,5-3,0%) моно- та дицукрів на формування біоплівки *S. epidermidis* у 6-лункових пластикових планшетах.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження стали 20 біоплівкоутворюючих штамів *S. epidermidis*, що були виділені з піхви жінок, носоглотки, поверхні шкіри та ран, які належать до музею кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара.

Формування біоплівок проводили за допомогою модифікованої методики [8]: у 6-лунковий планшет вносили 0,4 мл бактеріальної суспензії, що містила $1,04 \cdot 10^6$ КУО/мл та поміщали у термостат (37°C) на 3 год. Потім вносили 1,6 мл поживного середовища та знову поміщали у термостат (37°C).

Для визначення кількості життєздатних клітин у сформованій біоплівці з лунок планшета видаляли залишки поживного середовища за допомогою піпетки та тричі промивали біоплівку ізотонічним розчином (0,5% NaCl). За допомогою мікробіологічної петлі біоплівку переносили у скляний гомогенізатор з 1,0 мл ізотонічного розчину. З отриманої бактеріальної суспензії робили розведення та висів на чашки Петрі з МПА. Через 3 доби визначали кількість КУО/мл.

Під час вивчення впливу різних значень кислотності використовували МПБ з різними показниками рН, які знаходились в межах від 4,0 до 8,0. Приготування поживних середовищ з різними рН проводили таким чином: 1) для приготування та підтримки сталості середовища використовували МПБ та Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 буфер (рН 5,8-8,0); 2) фосфатний буфер(0,1 М) готували на основі одно- та двозаміщеного фосфату натрію у різних співвідношеннях. Середовище з показником рН 4 та 5 готували без додавання буферних розчинів з комерційних сухих МПБ згідно до інструкції з використання.

В експериментальних дослідженнях використовували такі моно- та дицукри, як: глюкоза, сахароза, лактоза та галактоза, концентраціями в МПБ від 0,5% до 3,0%. В якості контролю виступав МПБ без додавання цукрів.

Контролем виступали лунки, в які вносили МПБ та бактеріальну суспензію, що містила $1,0 \cdot 10^6$ клітин/мл – контроль біоплівкоутворення. Другим контролем виступало чисте МПБ та ізотонічний розчин (0,5% NaCl) – контроль поживного середовища.

Результати досліджень та їх обговорення. З наведених на **рис. 1** даних можемо зробити висновок, що найбільший приріст кількості клітин біоплівки відбувався при культивуванні у нейтральній зоні

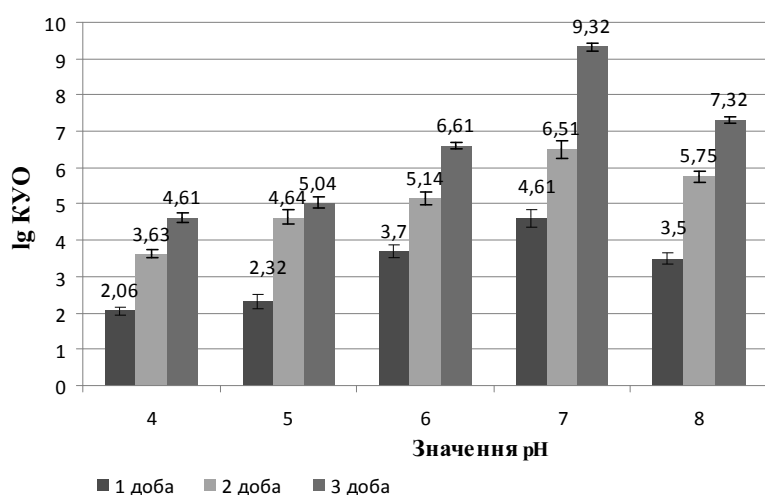


Рис. 1. Формування біоплівки *S. epidermidis* при культивуванні на поживному середовищі з різними значеннями рН протягом 3 днів.

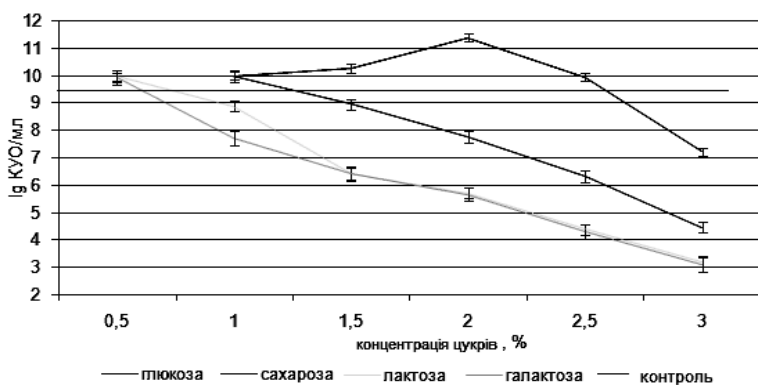


Рис. 2. Формування біоплівки *S. epidermidis* при культивуванні у поживному середовищі з різними концентраціями цукрів на 3 добу досліджень.

Примітка: контроль формувалася без додавання різних концентрацій цукру.

рН – кількість клітин складала $2,14 \cdot 10^9$ КУО/мл після 3 днів культивування.

При цьому ріст культури та утворення біоплівки спостерігали як за кислого, так і за лужного значень рН.

Через 3 доби культивування кількість клітин у біоплівці штамів *S. epidermidis* за рН середовища 5,0 була нижче у $1,904 \cdot 10^4$ разів, за рН 6,0 – у 512 разів, за рН 8,0 – у 100 разів порівняно з кількістю КУО/мл біоплівок, що формувалися у середовищі за нейтрального рН. За кислотності середовища 4,0 кількість клітин у культурі була нижче у $5,124 \cdot 10^4$ разів порівняно з контролем.

Особливий інтерес викликає вивчення можливих залежностей накопичення біомаси біоплівок від вмісту в поживному середовищі різних моносахаридів, як джерела енергії, так і пластичного матеріалу [10].

Вивчали вплив на формування біоплівок штамів *S. epidermidis* різних моно- та дицукрів: глюкози, сахарози, галактози та лактози у концентраціях у

поживному середовищі від 0,5% до 3,0%. На **рис. 2** наведено результати кількості клітин у біоплівках *S. epidermidis*, що формувалися у середовищах за різних концентрацій моно- та дицукрів на 3 добу досліджень.

Встановлено, що найбільша кількість клітин біоплівки спостерігалася при культивуванні у середовищі з 2,0% глюкози, що перевищувало у 26 рази кількість клітин у контролі. При цьому кількість КУО у контрольній біоплівці складала $9,034 \cdot 10^9$ клітин/мл. Концентрація глюкози, яка становила 1,5% також призводила до збільшення кількості КУО у біоплівці у 2,0 рази порівняно з контролем. При вмісті глюкози у поживному середовищі 3,0% відмічали пригнічення формування біоплівки, так як кількість клітин у біоплівці, яка формувалася при вказаній концентрації була менше у 564 рази порівняно з контролем.

Концентрації глюкози від 0,5% до 1,0% не викликали значних змін кількості клітин у біоплівці порівняно із контролем. Під час культивування біоплівок *S. epidermidis* у середовищах, що містили різні концентрації інших досліджуваних вуглеводів – сахарози, лактози та галактози, відбувалося зниження вмісту клітин біоплівки з підвищенням концентрації цукрів.

Нейтрально на формування біоплівки впливала сахароза концентрацією від 0,5% до 1,0%: кількість клітин відповідала контрольним показникам. Але підвищення концентрації сахарози у поживному середовищі до

1,5% викликало зниження кількості клітин у біоплівці у 11 разів порівняно з контролем. Подальше підвищення вмісту сахарози у середовищі культивування призводило до поступового зниження кількості клітин у біоплівці – до 2,0% – у 158 разів, до 2,5% – у $4,14 \cdot 10^3$ разів, до 3,0% – у $3,254 \cdot 10^5$ разів порівняно з контролем.

Не спостерігалось змін під час культивування біоплівки *S. epidermidis* у середовищі, що містило 0,5% лактози, але поступове підвищення концентрації вказаного вуглеводу призводило до зниження вмісту клітин біоплівки порівняно з контролем. Так, під час формування біоплівки у середовищі, що містило 1,0% лактози, відбувалося зниження кількості КУО у 12 разів, 1,5% лактози – у $3,54 \cdot 10^3$ разів, 2,0% – у $1,84 \cdot 10^4$ разів, 2,5% – у $3,94 \cdot 10^5$ разів, 3,0% лактози – у $5,64 \cdot 10^6$ разів порівняно з контролем.

Аналогічний ефект на формування біоплівки виявляла галактоза. Під час культивування у поживному середовищі, що містило 1,0% галактози, відбувалося зниження кількості КУО у 164 разів, при вмісті

1,5% – у $3,94 \cdot 10^3$ разів, 2,0% галактози – у $2,04 \cdot 10^4$ разів, 2,5% – у $4,54 \cdot 10^5$ разів, 3,0% галактози – у $7,46 \cdot 10^6$ разів порівняно з контролем.

Таким чином можна сказати, що найвища біомаса біоплівки була зафіксована за нейтрального рН, що є близькими до значення рН природніх осередків перебування штамів *S. epidermidis*. Разом з тим, формування біоплівки відбувалося при різних значеннях рН, як кислому, так і слабколужному. Це може розглядатися в якості важливої фізіологічної особливості метаболізму стафілококів, що сприяє формуванню біоплівок при екстремальних значеннях кислотності середовища.

Що стосується вивчення впливу різних концентрацій моно- та дисахаридів можна припускати, що поживні компоненти МПБ повністю забезпечують потреби системи біосинтезу вуглеводних компонентів біоплівки *S. epidermidis*. Крім того, показано [10], що можливо, у біоплівках стафілококів функціонують механізми, близькі до катаболітної репресії

утворення біоплівок, що знайдено у бактерій деяких видів родини *Enterobacteriaceae*.

Висновки.

1. Встановлено, що формування біоплівки *S. epidermidis* відбувається за кислих значень рН – 5,0-6,0 і слабколужних рН – 8,0.

2. Найвищий приріст кількості клітин у біоплівці спостерігали за рН 7,0 – $2,14 \cdot 10^9$ КУО/мл.

Найкраще на формування біоплівки *S. epidermidis* впливав вміст у поживному середовищі 2,0% глюкози – кількість клітин після 3 діб культивування становила $2,34 \cdot 10^{11}$ КУО/мл.

Перспективи подальших досліджень. Останнім часом, інфекції, що пов'язані з формуванням стафілококових біоплівок набули не аби якого розповсюдження. Біоплівки характеризуються високим ступенем стійкості до різноманітних агресивних факторів середовища. Тому вивчення впливу на формування біоплівок різних факторів середовища дозволить краще розуміти процеси, які лежать в основі розвитку різноманітних захворювань.

Література

1. Афиногенова А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – Т. 61, №3. – С. 119–125.
2. Гостев В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, №3. – С. 4-15.
3. Коробов В. П. Анализ чувствительности процессов формирования биопленок *Staphylococcus epidermidis* 33 к некоторым факторам внешней среды / В. П. Коробов, Л. М. Лемкия, В. И. Монахов // Вестник пермского университета. Серия Биология. – 2010. – Вып. 1, № 1. – 59-63 с.
4. Маянский А. Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение / А. Н. Маянский, И. В. Чеботарь // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2011. – № 1. – С. 101-108.
5. Николаев Ю. А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю. А. Николаев, В. К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №2. – С. 149-163.
6. Сидоренко С. В. Инфекции в интенсивной терапии / С. В. Сидоренко, С. В. Яковлев. – М. : Изд-во Бионика, 2003. – 205 с.
7. Смирнова Т. А. Структурно-функциональная характеристика биопленок / Т. А. Смирнова, Л. В. Диденко, Р. Р. Азизбекян [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №4. – С. 435–446.
8. Тец В. В. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии / В. В. Тец, Г. Ю. Кнорринг, Н. К. Артеменко [и др.] // Антибиотики и химиотерапия – 2004. – № 12 – С. 9-13.
9. Karlyshev A. V. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy / A. V. Karlyshev, M. V. McCrossan, B. W. Wren // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69. – P. 1–13.
10. Zahler J. Transmission electron microscopic study of antibiotic action on *Klebsiella pneumoniae* biofilm / J. Zahler, S. P. Stewart // Antimicrob. Agents Chemother. – 2002. – Vol. 46. – P. 2679–2683.
11. Wang X. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and general stress response / X. Wang, T. K. Wood // Applied and environmental microbiology – 2012. – Vol. 78. – P. 22.

УДК 579. 61:616-078

ВПЛИВ ФАКТОРІВ СЕРЕДОВИЩА НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Шевченко Т. М., Вінніков А. І.

Резюме. Встановлено, що формування біоплівки *S. epidermidis* відбувається у діапазоні рН 5,0-8,0, при рН 4,0 – спостерігали ріст культури біоплівкоутворюючих штамів. Найвищий приріст кількості клітин у біоплівці зафіксовано за рН 7,0 – $2,14 \cdot 10^9$ КУО/мл.

Найкраще на формування біоплівки *S. epidermidis* впливав вміст у поживному середовищі 2,0% глюкози – кількість клітин після 3 діб культивування становила $2,34 \cdot 10^{11}$ КУО/мл, що у 25 разів перевищувало кількість клітин у контрольних біоплівках. Вміст сахарози у поживному середовищі вище, ніж 1,0%, та галактози і лактози вище, ніж 0,5% – викликав пригнічення формування біоплівки.

Ключові слова: біоплівка, *S. epidermidis*, рН, глюкоза, сахароза, лактоза, галактоза.

УДК 579. 61:616-078

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*
Сидашенко О. И., Воронкова О. С., Шевченко Т. Н., Винников А. И.

Резюме. Определено, что формирование биопленки *S. epidermidis* происходит в диапазоне pH – 5,0-8,0, при pH 4,0 наблюдали рост культуры биопленкообразующих штаммов. Наибольший прирост количества клеток в биопленке наблюдали при pH питательной среды 7,0 – $2,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Более эффективно на формирование биопленки *S. epidermidis* влияло содержание в питательной среде 2,0% глюкозы – количество клеток после 3 суток культивирования составляло $2,34 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл, что в 25 раз превышало количество клеток в контрольных биопленках. Содержание сахарозы в питательной среде выше, чем 1,0%, а галактозы и лактозы выше, чем 0,5% – вызвало угнетение формирования биопленки.

Ключевые слова: биопленка, *S. epidermidis*, pH, глюкоза, сахароза, лактоза, галактоза.

UDC 579. 61:616-078

Effect of Environment Factors on Biofilm-Formation of *Staphylococcus Epidermidis*

Sidashenko O. I., Voronkova O. S., Shevchenko T. M., Vinnikov A. I.

Abstract. Environmental factors and properties of microbial cells influence the process of biofilms forming and their properties. The most important factors are habitat pH, salt concentration, osmolarity, partial pressure, availability of nutrients and surface hydrophobicity distribution phase, the strength and type of fluid motion relative to the surface.

Staphylococci are the one most known biofilm forming bacteria. Among them the top spot in their ability to biofilm-forming and infections associated with the formation of biofilms occupies *S. epidermidis*.

Established that biofilm formation by *S. epidermidis* is acidic pH – 5,0-6,0 and pH 8,0. The largest increase in the number of cells in the biofilm was observed at pH 7,0 – $2,1 \cdot 10^9$ CFU/ml. On the 3 day of cultivation the number of cells in the biofilm of *S. epidermidis* by pH 5,0 was lower in $1,90 \cdot 10^4$ times, for pH 6,0 – 512 times, for pH 8,0 – 100 times compared to the number CFU/ml biofilms that formed in medium with pH 7,0. Over acidity 4,0 the number of cells in culture was lower in $5,12 \cdot 10^4$ times compared with the control.

Best biofilm formation by *S. epidermidis* affected content of 2,0% glucose in the culture medium – number of cells after 3 days of cultivation was $2,34 \cdot 10^{11}$ CFU/ml, which is 25 times higher than the number of cells in the control biofilm. The content of sucrose in the culture medium is higher than 1,0%, and galactose and lactose is higher than 0,5% – caused inhibition of biofilm formation.

Thus, we can say that the highest biomass of biofilms was recorded by a pH 7,0, which is close to the natural pH of cells stays strains of *S. epidermidis*. However, biofilm formation occurred at different pH values as acidic and alkaline. This can be seen as an important physiological features of metabolic staphylococci, which promotes biofilms at extreme values of acidity.

As to study the effect of different concentrations of mono- and disaccharides can assume that culture medium fully address the needs of system components carbohydrate to biosynthesis of biofilm of *S. epidermidis*. Furthermore, it is shown, that may staphylococci in biofilm mechanisms operate close to katabolitic repression biofilms formation that bacteria found in some species of the family *Enterobacteriaceae*.

Keywords: biofilm, *S. epidermidis*, pH, glucose, sucrose, lactose, galactose.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 18. 08. 2014 р.