Вестник Томского государственного университета. Биология. 2015. № 1 (29). С. 28–36

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.861.2
doi: 10.17223/19988591/29/3

Д.В. Ерошенко, В.П. Коробов

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

Сравнительный анализ формирования и разрушения биопленок PIA-отрицательных бактерий *Staphylococcus epidermidis* под действием гидролитических факторов

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Пермского края по реализации научных проектов международными исследовательскими группами ученых по соглашению № С-26/632 и РФФИ (грант № 14-04-00687)

Проведен сравнительный анализ действия гидролитических ферментов и периодата натрия на различные этапы колонизации поверхности полистирола бактериями Staphylococcus epidermidis, обладающими PIA-отрицательным фенотипом. Установлено, что адгезия и образование биопленок всех изученных штаммов ингибируются трипсином (15–52% от контроля), лизоцимом (35–65%), ДНКазой (18–70%) и периодатом натрия (17–55%), за исключением процесса формирования биопленок штаммом S. epidermidis ATCC 29887 в присутствии ДНКазы. Внесение в инкубационные среды препаратов ДНК не оказывало значительного влияния ни на сорбцию бактериальных клеток, ни на последующее формирование биопленок всеми использованными в работе бактериальными штаммами. Суточные биопленки изученных штаммов стафилококков обладали устойчивостью к лизоциму и окислительному действию периодата натрия. Одновременно с этим биопленки штамма S. epidermidis ATCC 29887 разрушались после обработки трипсином (56±8%) и ДНКазой (63±16%), а биопленки штамма S. epidermidis GISK 33 – под действием РНКазы (70±11%). Установлено, что внесение РНКазы одновременно с инокулумом повышало адгезию S. epidermidis ATCC 12228 (143±32%), но подавляло образование биопленок S. epidermidis ATCC 29887(63±24%). Проведенные исследования свидетельствуют о том, что чувствительность сформированных биопленок исследованных штаммов стафилококков к литическому действию факторов внешней среды не всегда кореллирует с их влиянием на процессы прикрепления бактериальных клеток к поверхностям и последующего образования на них биопленок. В то время как последние два процесса имеют прямую зависимость друг от друга.

Ключевые слова: *Staphylococcus epidermidis*; *адгезия; биопленки; трипсин; лизоцим; ДНКаза*.

Введение

Бактерии вида *Staphylococcus epidermidis* являются частью нормальной микрофлоры кожи и слизистых человека и животных [1]. Обладая выражен-

ной способностью к образованию биопленок на поверхностях различных материалов, в том числе на поверхностях полимерных и металлических медицинских устройств, бактерии *S. epidermidis* составляют около 80% штаммов, участвующих в биоматериал-ассоциированных инфекциях [2].

В естественной среде практически все бактерии существуют в виде биопленок – сообществ бактериальных клеток, необратимо прикрепленных к биотическим и абиотическим поверхностям и заключенных в сложный экзополимерный матрикс, преимущественно содержащий полисахаридные и белковые компоненты, а также нуклеиновые кислоты [3].

Известно, что процесс образования биопленок включает в себя две основные фазы: первичную адгезию бактерий к поверхности и формирование многослойных клеточных кластеров, обусловленных продукцией особых соединений, формирующих межклеточный матрикс. Активными участниками этих процессов являются разнообразные поверхностно-ассоциированные структуры, в том числе белковые молекулы и полисахариды [3]. Не последнюю роль во взаимодействии бактерий с поверхностью играет внеклеточная ДНК (экзДНК) [4, 5]. Однако конкретный вклад данных структур на каждом определенном этапе развития биопленок изучен недостаточно.

Таким образом, целью настоящего исследования было изучение влияния литических факторов, способных избирательно действовать на компоненты бактериальных клеток, на адгезию, образование и разрушение биопленок бактерий *Staphylococcus epidermidis*.

Материалы и методики исследования

В качестве объектов исследования использовали штаммы бактерий вида *Staphylococcus epidermidis*: *S. epidermidis* GISK 33 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов «Научного центра экспертизы средств медицинского применения» МЗ России, Москва), *S. epidermidis* ATCC 12228 и *S. epidermidis* ATCC 29887. Бактерии выращивали на жидкой питательной среде Luria–Bertani (LB), культивируя при 37°C и 160 об/мин до достижения культурами логарифмической фазы роста, осаждали (12 000×g, 5 мин), осадки дважды промывали 0,14 M NaCl и ресуспендировали в среде LB, содержащей лизоцим (10 мг/мл, «Sigma», США), трипсин (100 мкг/мл, «ICN Biomedicals Inc.», США), ДНКазу I типа (100 мкг/мл, «Биолот», Россия), ДНК из селезенки крупного рогатого скота (5 мкг/мл, «Олайнский завод химреактивов», Латвия), РНКазу (100 мкг/мл, «Биолот», Россия) или $NaIO_4$ (10 мМ, «Sigma», США) до концентрации 10^7 КОЕ/мл, и проводили оценку адгезивных и биопленкообразующих свойств бактерий. В контрольных экспериментах и в опытах по действию факторов среды на суточные биопленки использовали суспензии бактерий с той же концентрацией в среде LB без добавления ферментов.

Адгезивные свойства бактерий оценивали по способности сорбироваться на поверхности полистирола (чашки Петри, 40 мм, «Медполимер», Россия)

во время инкубации при 37°С в течение 30 мин [6]. Количество связавшихся с поверхностью бактерий оценивали прямым подсчетом клеток в поле зрения после окрашивания их раствором кристаллического фиолетового (0,1%). Подсчет адгезированных клеток проводили на микровизоре «μViso-103» («ЛОМО», Россия) не менее чем в 10 полях зрения при увеличении ×2 500.

Биопленкообразующую способность бактерий *S. epidermidis* определяли методом выращивания в ячейках 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета («Медполимер», Россия) [7]. В лунки вносили по 200 мкл бактериальной суспензии (10^7 КОЕ/мл) в среде LB, содержащей фермент или соответствующий буферный раствор в указанных выше концентрациях, инкубировали при 37°С в течение 24 ч, после чего планктонную культуру отделяли аспирацией, лунки планшета с биопленками трижды промывали 10 мМ натрий-фосфатным буфером (ФБ, pH = 7,2), высушивали и окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового в течение 20 мин, излишки красителя удаляли двукратной промывкой дистиллированной водой, а связавшийся краситель экстрагировали этанолом (96%) в течение 30 мин. Биомассу пленок оценивали по оптической плотности полученных экстрактов при 570 нм на планшетном спектрофотометре «Benchmark Plus»(«Biorad», США).

Литическое действие ферментов и периодата натрия изучали на суточных биопленках, выращенных в среде LB согласно описанному выше методу [7]. После троекратной промывки пленок 10 мМ ФБ (pH = 7,2) в каждую лунку вносили 100 мкл раствора исследуемого вещества в указанной выше концентрации и инкубировали при 37°С в течение 2 ч. В контрольные образцы вносили 0,14 М NaCl или буферный раствор. После действия литических факторов биомассу пленок оценивали по связыванию кристаллического фиолетового.

Тестирование бактерий *S. epidermidis* на способность к секреции полисахаридного межклеточного адгезина (PIA) проводили, выращивая их на агаризованной среде LB с добавлением 0,5% глюкозы и 0,08% красителя Конго красный [8]. Результаты оценивали после инкубации при 37°С в течение 24 ч.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных и построение графиков проведены с использованием программы «Prism 6» («GraphPad», США). Полученные данные представлены в виде средних арифметических с 95% доверительным интервалом.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты сравнительного изучения образования биопленок и чувствительности уже сформированных на поверхности полистирола суточных биопленок в присутствии ферментов, расщепляющих белки (трипсин), нуклеиновые кислоты (ДНКаза и РНКаза) и клеточные стенки бактерий (лизоцим), и периодата натрия, окисляющего α-гликольные группировки углеводов,

показали, что лизоцим и периодат натрия при внесении в среду одновременно с бактериями отрицательно влияют как на процессы адгезии, так и на формирование биопленок всеми исследованными в работе штаммами (рис. 1). Высокая чувствительность первых этапов формирования биопленок к действию лизоцима и периодата натрия, скорее всего, связана со способностью этих соединений разрушать пептидогликан в составе клеточной стенки бактерий.

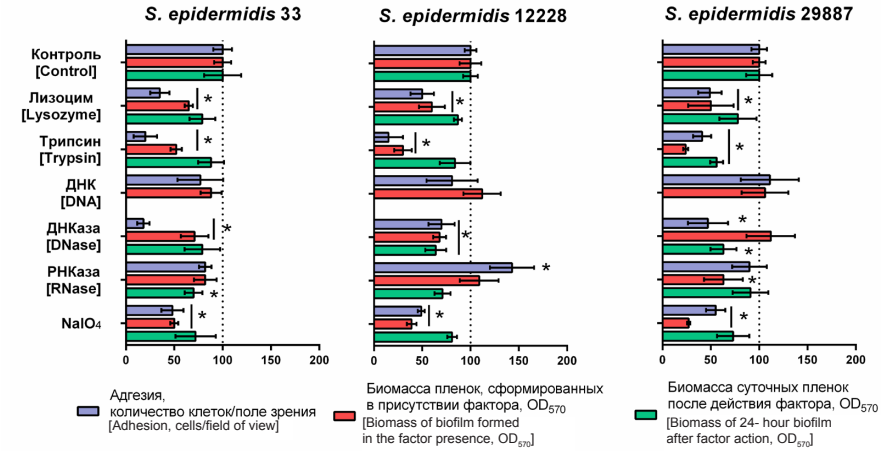

Рис. 1. Действие ферментов, препаратов ДНК и периодата натрия на адгезию бактериальных клеток, образование и разрушение биопленок бактерий *Staphylococcus epidermidis*. Данные представлены в виде средних арифметических с доверительными интервалами (ось абсцисс – отношение величин к контролю, %). * $p < 0,05$

[**Fig. 1.** The effect of enzymes, DNA, and sodium periodate on the adhesion, formation and destruction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm. Data are presented as arithmetic means with confidence intervals (the abscissa axis - ratio to control, %). * $p < 0.05$]

Вместе с тем необходимо отметить, что суточные биопленки всех изученных нами штаммов обладали устойчивостью к лизоциму и окислительному действию периодата натрия. Вероятно, это связано с отсутствием в матриксе полисахаридного межклеточного адгезина, который представляет собой полимер N-ацетилглюкозамина [9] и является мишенью действия данных гидролитических факторов [10].

Действительно, отсутствие способности к синтезу PIA у исследованных стафилококков было подтверждено с помощью тестирования с использованием агара с индикатором Конго красный. Бактерии этих штаммов при выращивании на данной среде формируют красные колонии (рис. 2), что свидетельствует о PIA-негативном фенотипе [8]. В таком случае, согласно литературным данным, основным компонентом матрикса биопленок стафилококков чаще всего являются белковые соединения [11].

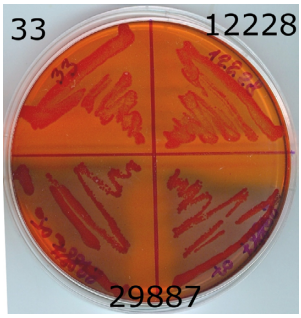

Рис. 2. Детекция полисахаридного межклеточного адгезина (PIA) на плотной среде с красителем Конго красный при росте бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33, *Staphylococcus epidermidis* 12228 и *Staphylococcus epidermidis* 29887. Красная окраска колоний – отрицательный результат (фото Д.В. Ерошенко)

[**Fig. 2.** Detection of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) on Congo red agar during the growth of *Staphylococcus epidermidis* 33, *Staphylococcus epidermidis* 12228, and *Staphylococcus epidermidis* 29887. The red color of the colonies is a negative result (Photo - DV Eroshenko)]

Считается, что из-за преобладания белковых компонентов в составе матрикса биопленок, образованных PIA-отрицательными стафилококками, они характеризуются высокой чувствительностью к трипсину [11]. Действительно, проведенные нами эксперименты показали, что внесение трипсина вызывало не только разрушение сформированных биопленок (*S. epidermidis* 29887), но и при одновременном внесении с инокулумом снижало как количество сорбированных клеток на 59–85%, так и биомассу формирующихся пленок на 48–76% для всех тестированных штаммов (см. рис. 1). Поскольку трипсин в использованной концентрации не оказывал бактерицидного действия на бактерии, можно предполагать, что в его присутствии происходит гидролиз определенных белков, необходимых для колонизации поверхности и образования биопленки, а также для удержания клеточных агломератов в составе сформированных пленок.

Согласно литературным данным, внеклеточная ДНК является важным компонентом матрикса биопленок *S. epidermidis* [4, 5]. Отмечается, что ингибирование процесса образования биопленок проявляется в большей степени при добавлении фермента ДНКазы одновременно с инокулятом [5]. Действительно, нами обнаружено, что суточные биопленки двух из трех исследованных штаммов обладали чувствительностью к литическому действию ДНКазы. Одновременно с этим наши эксперименты показали, что внесение ДНКазы подавляет формирование биопленок на 32–39% у штаммов *S. epidermidis* 33 и 12228. Исключение составлял штамм *S. epidermidis* 29887, биопленки которого в присутствии ДНКазы обладали биомассой, соответствующей контролю. Кроме того, показано, что внесение ДНКазы приводит к снижению адгезии

бактерий к поверхности на 30–82% для всех трех штаммов (см. рис. 1). Считается, что ключевая роль экзДНК на первых этапах развития биопленки, по-видимому, связана с увеличением интенсивности кислотно-основных взаимодействий как между клетками и поверхностью, так и непосредственно между бактериальными клетками [5]. В то же время нами показано, что дополнительное внесение чужеродной ДНК не оказывало значительного эффекта ни на сорбцию бактериальных клеток, ни на последующее формирование биопленок для всех исследованных в работе штаммов (см. рис. 1).

Интересно отметить, что все исследованные бактериальные штаммы проявили различную чувствительность к действию РНКазы (см. рис. 1). В связи с тем, что в литературе практически нет данных о стимулирующем или ингибирующем действии РНКазы на процессы образования биопленок стафилококков [5] и РНК не считается основным компонентом матрикса биопленок, можно предположить, что обнаруженные эффекты в первую очередь связаны с разрушением мРНК или тРНК, которые участвуют в процессах синтеза белка.

Заключение

В связи с широким распространением гидролитических ферментов, в частности протеаз, в препаратах бытовой химии исследование влияния этих соединений на представителей нормальной микрофлоры человека, к которым относятся бактерии *S. epidermidis*, несет несомненную практическую пользу. Кроме того, данные о способности гидролаз угнетать образование биопленок стафилококков могут быть использованы в рамках такого развивающегося направления медицины, как системная энзимотерапия. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что снижение количества сорбированных клеток под действием гидролаз хорошо согласуется с торможением процесса формирования биопленок в целом. Одновременно с этим в процессе развития биопленок стафилококков соотношение компонентов в матриксе, вероятнее всего, претерпевает существенные изменения, что приводит к изменению чувствительности биопленок к гидролитическим ферментам по сравнению с действием энзимов на первые этапы развития этих особых бактериальных сообществ.

Литература

1. *Дерябин Д.Г.* Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург : УрО РАН, 2000. 239 с.
2. *Götz F.* Staphylococcus and biofilms // Molecular Microbiology. 2002. Vol. 43, № 6. P. 1367–1378.
3. *O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R.* Biofilm formation as microbial development // Annual review of microbiology. 2000. Vol. 54. P. 49–79.
4. *Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B.* Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus*

and *Staphylococcus epidermidis* biofilms // Applied and environmental microbiology. 2008. Vol. 74, № 2. P. 470–476.
5. *Qin Z., Ou Y., Yang L., Zhu Y., Tolker-Nielsen T., Molin S., Qu D.* Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* // Microbiology. 2007. Vol. 153. P. 2083–2092.
6. *Ерошенко Д.В., Лемкина Л.М., Коробов В.П.* Адгезия бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 при действии некоторых физико-химических факторов среды // Вестник Пермского университета. Биология. 2012. Вып. 1. С. 29–33.
7. *Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci // Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2007. Vol. 115, № 8. P. 891–899.
8. *Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T.* New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci // Journal of clinical pathology. 1989. Vol. 42. P. 872–874.
9. *Mack D., Davies A.P., Harris L.G., Knobloch J.K.M., Rohde H. Staphylococcus epidermidis* biofilms: Functional molecules, relation to virulence, and vaccine potential // Topics in Current Chemistry. 2009. Vol. 288. P. 157–182.
10. *Qin Z., Yang X., Yang L., Jiang J., Ou Y., Molin S., Qu D.* Formation and properties of *in vitro* biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates // Journal of Medical Microbiology. 2007. Vol. 56. P. 83–93.
11. *Rohde H., Burandt E.C., Siemssen N., Frommelt L., Burdelski C., Wurster S., Scherpe S., Davies A.P., Harris L.G., Horstkotte M.A., Knobloch J.K.M., Ragunath C., Kaplan J.B., Mack D.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections // Biomaterials. 2007. Vol. 28, № 9. P. 1711–1720.

Поступила в редакцию 30.12.2014 г.; повторно 15.01.2015 г.; принята 17.02.2015 г.

Авторский коллектив:
Ерошенко Дарья Владимировна – м.н.с лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь, Россия).
E-mail: dasha.eroshenko@gmail.com
Коробов Владимир Павлович – доцент, канд. мед. наук, зав. лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь, Россия).
E-mail: korobov@iegm.ru

Eroshenko DV, Korobov VP. Comparative analysis of PIA-negative Staphylococcus epidermidis biofilm formation and destruction under hydrolytic factors. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2015;1(29):28-36. doi: 10.17223/19988591/29/3. In Russian, English summary

Daria V. Eroshenko, Vladimir P. Korobov

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation.

Comparative analysis of PIA-negative *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and destruction under hydrolytic factors

The ability of Gram-positive bacteria *Staphylococcus epidermidis* to adhere to and form biofilm on various polymeric and metallic surfaces of indwelling medical devices results in the fact that now these bacteria are one of the most common causes of serious nosocomial infections. Although the adhesion is an essential part of biofilm

formation the primary contact between the bacterial cells and the solid surface do not always lead to a strong fixation of bacteria on it. Therefore, the comparison of the hydrolytic enzymes and sodium periodate influenced the bacterial adhesion (30 min) and biofilm formation (24 h), and the destruction of the already formed biofilm *S. epidermidis* occured. According to Congo red agar assay, all tested *S. epidermidis* strains lacked the ability to produce polysaccharide intercellular adhesion and polymer of N-acetylglucosamine which promotes the biofilm formation on solid surfaces. Adhesion and biofilm formation of all studied strains were strongly inhibited by trypsin (15-52% of control), lysozyme (35-65%), DNase (18-70%) and sodium periodate (17-55%), except *S. epidermidis* ATCC 29887, the biofilm formation of which was similar to control at the DNase presence. Although the extracellular DNA plays an important role in the bacterial colonization, the addition of the cattle DNA did not affect all stages of biofilm development for all used strains. The preformed biofilm of all studied strains was resistant to the lysozyme and the sodium periodate as their biofilm matrix do not contain the PIA. At the same time, *S. epidermidis* ATCC 29887 biofilm was destroyed after treatment with trypsin (56±8%) and DNase (63±16%), and *S. epidermidis* GISK 33 biofilm - after the RNase treatment (70±11%). However, the effect of RNase differed between strains as well as between the moments of its introduction into the medium. Adding RNase simultaneously with inoculum stimulated adhesion of *S. epidermidis* ATCC 12228 (143±32 %) and inhibited biofilm formation of *S. epidermidis* ATCC 29887 (63±24 %). Our results show that the relationship between the sensitivity of mature biofilm to the treatment by hydrolytic factors such as enzymes and the influence of these factors on the biofilm formation is not linear. On the contrary, the processes of attachment of bacterial cells and subsequent biofilm formation are directly interdependent.

Acknowledgments: This work was partially supported by the Ministry of Education and Science of Perm Kray agreement № C-26/632 and RFBR grant № 14-04-00687.

The article contains 2 Figures, 11 References.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*; adhesion; biofilm; trypsin; lyzosyme; DNase.

References

1. Deryabin DG. Stafilokokki: ekologiya i patogennost' [Staphylococci: ecology and pathogenicity]. Ekaterinburg: Ural Branch of Russian Academy of Science Publ.; 2000. 239 p. In Russian
2. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1367-1378. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02827.x
3. O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
4. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(2):470-476. doi: 10.1128/AEM.02073-07
5. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 2007;153:2083-2092. doi: 10.1099/mic.0.2007/006031-0
6. Eroshenko DV, Lemkina LM, Korobov VP. Adhesion of bacteria *Staphylococcus epidermidis* 33 during the effects of some physicochemical environmental factors. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya*. 2012;1:29-33. In Russian, English summary

7. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891-899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
8. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42:872-874. doi: 10.1136/jcp.42.8.872
9. Mack D, Davies AP, Harris LG, Knobloch JKM, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: Functional molecules, relation to virulence, and vaccine potential. *Top Curr Chem*. 2009;288:157-182. doi: 10.1007/128_2008_19
10. Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, Qu D. Formation and properties of *in vitro* biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2007;56(1):83-93. doi: 10.1099/jmm.0.46799-0
11. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK-M, Ragunath C, Kaplan JB, Mack D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*. 2007;28(9):1711-1720. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.046

Received 30 December 2014;
Revised 15 January 2015;
Accepted 17 February 2015

Authors info:
Eroshenko Daria V, junior researcher, Laboratory of Microorganisms' Biochemical Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13 Golev Str., Perm 614081, Russian Federation.
E-mail: dasha.eroshenko@gmail.com
Korobov Vladimir P, Cand. Sci. (Biol.), Ass. Professor, Head Laboratory of Microorganisms' Biochemical Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13 Golev Str., Perm 614081, Russian Federation.
E-mail: korobov@iegm.ru