

БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОРСКОЙ СРЕДЫ

Голозубова Ю.С.^{1,2}, Бузолева Л.С.^{1,2}, Ким А.В.², Еськова А.И.¹, Богатыренко Е.А.²

¹ ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток, e-mail: know-26@mail.ru;

² ФГБОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток

В статье приведены результаты изучения способности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из морской воды, к формированию биопленок. Биопленкообразование определяли по способности к адсорбции кристалвиолета этанолом в единицах оптической плотности. Установлено, что у штаммов, изолированных из морской воды, формирование биопленок при культивировании на питательных средах происходит более активно при 22 °С, чем при 5 °С и 37 °С вне зависимости от питательной среды. Было изучено влияние мясо-пептонного бульона и среды для морских микроорганизмов на биопленкообразование бактерий. Наиболее высокие показатели пленкообразования при культивировании на питательных средах были выявлены у рода *Escherichia*. Показана разная степень биопленкообразования у *Escherichia coli* в связи со штаммоспецифичностью и местом выделения.

Ключевые слова: бактерии семейства Enterobacteriaceae, биопленки, морская среда, антропогенное загрязнение, факторы среды.

BIOFILMS PROPERTIES OF THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE, ISOLATED FROM SEA WATER

Golozubova Y.S.^{1,2}, Buzoleva L.S.^{1,2}, Kim A.V.², Eskova A.I.¹, Bogatyrenko E.A.²

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, e-mail: know-26@mail.ru;

² Far Eastern Federal University, Vladivostok

The article presents the results of studying the capacity of bacteria of the family *Enterobacteriaceae* which isolated from sea water to form biofilms. Biofilm formation was determined by the ability to adsorb crystal violet with ethanol in units of optical density. It has been established that for strains isolated from sea water, the formation of biofilms during cultivation on nutrient media which occurred more actively at 22 °C than at 5 °C and 37 °C regardless of the nutrient medium. The influence of meat-peptone broth and medium for marine microorganisms on biofilm formation of bacteria of the *Enterobacteriaceae* family was studied. The highest film formation during cultivation on nutrient media was found in the genus *Escherichia*. A different degree of biofilm formation was observed in *Escherichia coli* due to strain specificity and site of excretion.

Keywords: family *Enterobacteriaceae*, biofilms, marine microorganisms, communities, anthropogenic pollution.

Урбанизация и индустриализация прибрежных морских акваторий моря приводит к высокому уровню загрязненности различными поллютантами (нефтеуглеводороды, тяжелые металлы, фенолы и др.) [1]. Существенную долю поллютантов составляют органические вещества, поступающие из хозяйственно-бытовых стоков, вместе с которыми в морскую среду попадают патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, являющиеся опасными в эпидемиологическом отношении как для гидробионтов, так и для людей [2].

Прибрежная зона Приморского края, особенно в районе крупных портовых городов, относится к акваториям с высоким уровнем загрязнения. Бухта Золотой Рог является наиболее загрязненным участком залива Петра Великого Приморского края. На берегах бухты расположены Владивостокский морской торговый порт, Владивостокский рыбный порт, судоремонтный завод «Дальзавод», а также части Тихоокеанского флота. На берегу бухты Находка располагаются Находкинский морской торговый порт, Находкинский

морской рыбный порт, НСРЗ и ПСРЗ - крупнейшие предприятия города Находки. Таким образом, бухты находятся в условиях антропогенного пресса.

Также бухта Золотой Рог и бухта Находка на основании микробиологических показателей характеризуются свежим и хроническим фекальным загрязнением [3]. Индикаторами фекального загрязнения морских вод являются бактерии группы кишечной палочки. В эту группу входят микроорганизмы таких родов, как: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella* и др., которые, попадая в организм человека через употребление в пищу гидробионтов, могут вызывать инфекционные заболевания [4]. За последние 30 лет в инфекционной патологии человека возросла роль бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые вызывают до 50% всех случаев септицемии и до 70% инфекций мочевыводящих путей [5].

Одним из механизмов формирования фенотипической устойчивости микроорганизмов к факторам внешней среды является их способность к образованию биопленок [6]. Формирование сообщества микроорганизмов обеспечивает физиологическую и функциональную стабильность и конкурентную выживаемость в экологической нише [7].

По данным литературы известно, что бактерии семейства *Enterobacteriaceae* могут образовывать биопленки в речных экосистемах [8], животных и человеке [2] в морской среде [9].

Цель исследования

Целью исследования явилось изучение влияния разных условий среды на формирование биопленки у бактерий рода *Enterobacteriaceae*, выделенных из морской воды.

Материалы и методы исследования

Исследовали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, выделенные из прибрежных вод бухт Золотой Рог и Находка. С поверхности морской воды на глубине 15-20 см были стерильно отобраны пробы воды. Воду фильтровали через мембранный фильтр Millipore диаметром 0,2 мкм и фильтр переносили на среду СММ (питательная среда для морских микроорганизмов [10; 11]. Учет выросших колоний проводили на следующие сутки. Полученные изолированные колонии были описаны в соответствии с классическими микробиологическими методами [12]. Для получения чистых культур выделенных микроорганизмов часть изолированной колонии каждого морфотипа была перенесена на столбик косога агар. Полученные чистые культуры были тестированы на принадлежность к семейству *Enterobacteriaceae* с помощью селективной среды Эндо. Выросшие на среде Эндо микроорганизмы были идентифицированы с помощью тест-набора RapID 20 E (Biomérieux).

Оценка способности исследуемых бактерий к биопленкообразованию проводилась по стандартному методу [13; 14]. Степень пленкообразования измеряли в единицах оптической

плотности. Биопленки выращивали на питательном бульоне и среде для морских микроорганизмов (СММ) при температуре культивирования 5, 22, 37 °С в течение 3 суток. Контрольной средой была питательная среда (МПБ или СММ соответственно) без внесения микроорганизмов в лунки планшетов. Статистическую обработку проводили с использованием параметрических методов. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента [15].

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы в исследуемых бухтах было выделено и идентифицировано 15 штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: в бухте Золотой Рог - 9 штаммов, в бухте Находка – 6 штаммов (рис. 1).

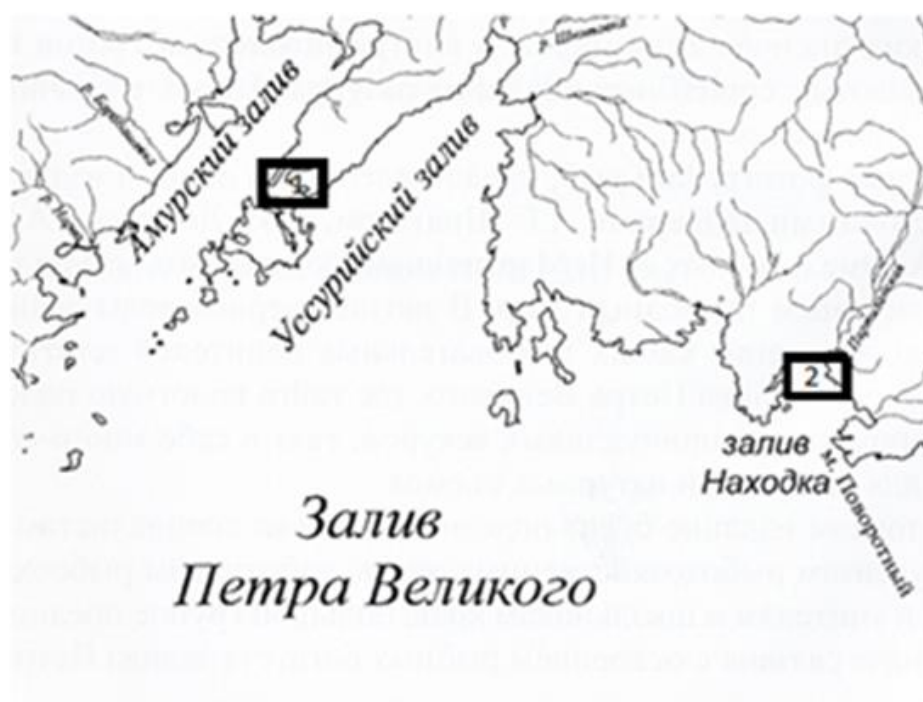


Рис. 1. Карта-схема районов исследования: 1 - бухта Золотой Рог; 2 - бухта Находка

Полученные изоляты были идентифицированы до родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella* и *Pantoea*. Доминирующим из них был род *Escherichia* (в бухте Золотой Рог 75% от всех энтеробактерий, в бухте Находка – 50%) (рис. 2). Возможно, это связано с высокой устойчивостью этих микроорганизмов к факторам среды, что способствует сохранению энтеробактерий в морской воде [8].

Следует отметить, что в водах обеих бухт обнаружены бактерии рода *Klebsiella*, в б. Находка - *Shigella*, а в б. Золотой Рог – *Pantoea*, имеющие важное эпидемиологическое значение (рис. 2.).

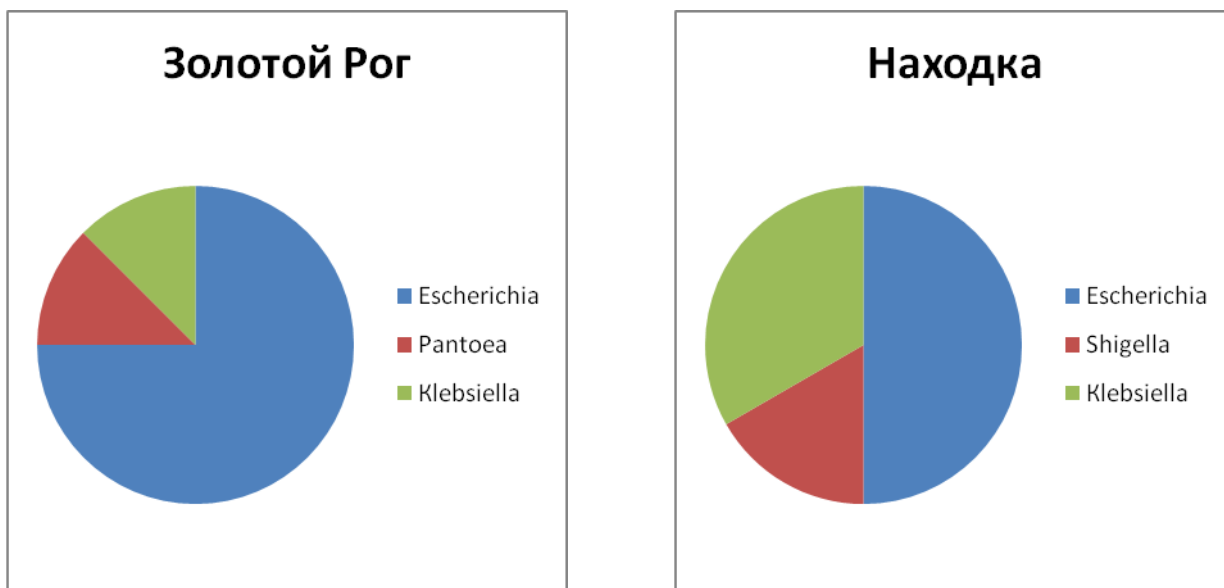


Рис.2. Встречаемость бактерий группы кишечной палочки в морской воде из районов с антропогенной нагрузкой

Для изучения биопленкообразующих свойств были отобраны следующие представители семейства *Enterobacteriaceae*: в бухте Золотой Рог - 16 ЗР (*E. coli*), 13 ЗР (*Klebsiella*), 42 М (*Pantoea*), в бухте Находка – 27 Н (*E. coli*), 16 Н (*Klebsiella*), 15 Н (*Shigella*).

Было показано, что все выделенные изоляты обладали биопленкообразующими свойствами, кроме бактерий, относящихся к роду *Shigella*. Существование микроорганизмов в состоянии биопленок имеет адаптивное значение, так как известно, что биопленки микроорганизмов обладают повышенной устойчивостью к стрессовым факторам.

Наилучшие биопленкообразующие свойства среди всех изученных штаммов бактерий были обнаружены у *Escherichia coli* (табл.). При этом среди всех штаммов можно выделить штамм 16 ЗР *E. coli*, выделенный из бухты Золотой Рог. Разная степень биопленкообразования у бактерий *E. coli* согласуется с данными литературы, является штаммоспецифичной и зависит от серорезистентности и физико-химических свойств конкретного штамма [16].

Влияние температуры и среды культивирования на биопленкообразующие свойства бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

Название изолятов	5 °С	22 °С	37 °С
Мясо-пептонный бульон (МПБ)			

16 ЗР <i>E. coli</i>	2,015±0,017*	2,353±0,019*	1,091±0,009*
27 Н <i>E. coli</i>	0,323±0,008*	1,997±0,012*	0,735±0,011*
15 Н <i>Shigella spp</i>	0,700±0,013*	1,123±0,011*	0,625±0,008*
16Н <i>Klebsiella spp</i>	0,073±0,009	0,263±0,014*	0,106±0,009
13 ЗР <i>Klebsiella spp</i>	0,09±0,002	0,365±0,004*	0,135±0,003
42 М <i>Pantoea spp</i>	0,843±0,012*	1,064±0,013*	0,474±0,018*
Контрольная среда (МПБ)	0,143±0,001	0,146±0,001	0,145±0,001
Среда для морских микроорганизмов (СММ)			
16 ЗР <i>E. coli</i>	2,003±0,001*	2,350±0,016*	1,761±0,007*
27 Н <i>E. coli</i>	0,163±0,007*	0,383±0,001*	0,505±0,011*
15 Н <i>Shigella spp</i>	0,153±0,005*	0,702±0,008*	0,510±0,009*
16Н <i>Klebsiella spp</i>	0,123±0,006	0,254±0,010*	0,463±0,010*
13 ЗР <i>Klebsiella spp</i>	0,07±0,001	0,303±0,006*	0,105±0,004
42 М <i>Pantoea spp</i>	0,724±0,009*	1,165±0,013*	0,305±0,005*
Контрольная среда (СММ)	0,152±0,001	0,153±0,001	0,153±0,001

Примечание: показатели $M \pm m$; * различия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Как видно из данных, представленных в таблице, оптимальной температурой культивирования для образования биопленок у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, является температура 22 °С вне зависимости от питательной среды. При более высокой или низкой температуре способность образовывать биопленки штаммами энтеробактерий, выделенными из морской воды, снижается, что согласуется с данными литературы [8]. Следует отметить, что при сравнении наших результатов и данных литературы [8], при одинаковом методическом подходе у штаммов *E. coli* и бактерий рода *Pantoea*, выделенных из морской воды, степень биопленкообразования по показаниям ОП при 22 °С на мясо-пептонном бульоне (МПБ) выше по сравнению со штаммами этих же родов, выделенными из пресной речной воды. По данным этих же авторов, биопленкообразование у *E. coli*, выделенных из пресных вод, при 37 °С отсутствует (ОП=0,000) [13], что заметно отличается от наших результатов (табл. 1).

Следует отметить, что бактерии рода *Klebsiella* не образовывали биопленки при исследуемых температурах и средах культивирования в наших экспериментах. Однако, по литературным данным, бактерии этого рода, выделенные от животных, обладали более высокими биопленкообразующими свойствами, чем биопленки, образуемые *E. coli* [17].

Таким образом, установлено, что оптимальной температурой культивирования для образования биопленок у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из морской

воды, является температура 22 °С вне зависимости от питательной среды. Исключение составили бактерии, относящиеся к роду *Shigella*, которые образовывали биопленки лучше в питательном бульоне, чем в морской среде. Сочетанное действие температуры и среды культивирования может влиять на степень биопленкообразования у бактерий.

Заключение

Было показано, что большинство родов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* образуют биопленки, что позволяет им существовать длительное время в морской среде в условиях антропогенного стресса. Процесс образования биопленок обеспечивает физиологическую и функциональную стабильность и конкурентную выживаемость в экологической нише этих бактерий. Это подчеркивает важность изучения этого семейства как условно-патогенных бактерий, в случае благоприятных условий поражающих организм человека. В ходе исследования выявлена зависимость биопленкообразующих свойств бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из морской среды, от температуры культивирования. Оптимальной температурой культивирования для образования биопленок у бактерий семейства *Enterobacteriaceae* является температура 22 °С (средняя температура поверхностных морских вод в летний период) вне зависимости от питательной среды. При более высокой или низкой температуре способность образовывать биопленки штаммами энтеробактерий, выделенными из морской воды, снижается. Наилучшие биопленкообразующие свойства среди всех изученных штаммов бактерий были обнаружены у бактерий *Escherichia coli* (штамм 16 З.Р. *E. coli*), выделенных из бухты Золотой Рог. Разная степень биопленкообразования у бактерий *E. coli* согласуется с данными литературы, является штаммоспецифичной и зависит от серорезистентности и физико-химических свойств конкретного штамма. Установлено, что в морских акваториях степень биопленкообразования выше, по сравнению с речными штаммами, согласно данным литературы. Это еще раз подчеркивает, что биопленкообразующие свойства микроорганизмов одного и того же вида зависят от источника их выделения из окружающей среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Соглашение № 14-50-00034).

Список литературы

1. Галышева Ю.А. Экологические факторы морской среды: учебное пособие. - Владивосток: Изд-во Дальневосточного ун-та, 2009. - 99 с.

2. Анганова Е.В. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биопленок / Е.В. Анганова, Е.Д. Савилов, О.А. Ушкарева и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2014. - № 5 (99). - С. 34-37.
3. Бойченко Т.В. Химико-экологическая и микробиологическая оценка качества морских поверхностных вод Южного Приморья: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / [Место защиты: Дальневост. гос. ун-т]. - Владивосток, 2009. - 150 с.
4. Лаженцева Л.Ю., Шульгина Л.В., Ким Э.Н. Микроорганизмы сырья прибрежного лова и их влияние на безопасность продукции. – Владивосток: Дальрыбтуз, 2013. – 243 с.
5. Поздеев О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей / О.К. Поздеев, Р.В. Федоров. - ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.
6. Garrett T.R. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces / T.R. Garrett, M. Bhakoob, Z. Zhanga // Progress in Natural Science. – 2008. - V. 18. – P. 1049-1056.
7. Сомов Г.П. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды / Г.П. Сомов, Л.С. Бузолева. – Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. - 167 с.
8. Ушкарева О.А. Способность водных изолятов к формированию биопленочных сообществ в различных условиях культивирования / О.А. Ушкарева, Е.В. Анганова, А.В. Духанина, Е.В. Верховина // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). - 2014. - № 7. - С. 102-103.
9. Shikumaa N.J. Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for Escherichia coli and Vibrio cholera / N.J. Shikumaa, M.G. Hadfieldb // Biofouling. - 2010. – V. 26. – P. 39–46.
10. Бузолева Л.С. Микробные сообщества поверхностных прибрежных вод бухты Золотой Рог в условиях высокого антропогенного загрязнения / Л.С. Бузолева, Е.Г. Калитина, И.П. Безвербная, А.М. Кривошеева // Океанология. - 2008. - № 6 (48). - С. 819-825.
11. Бузолева Л.С. Микробиологическая оценка качества природных вод. – Владивосток: Изд-во Морского гос. ун-та им. Адм. Г.И. Невельского, 2012. – 91 с.
12. Винникова О.И. Выделение и идентификация бактерий: методические рекомендации для студентов биологического факультета специализации «Микробиология и вирусология» / О.И. Винникова, А.М. Самойлов, Ю.В. Попова. – Харьков: ХНУ имени В.Н. Каразина, 2011. - 60 с.
13. Романова Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журнал эпидемиологии, микробиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 3. – С. 99-109.
14. Peeters E. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates / E. Peeters, H.J. Nelis, T. Coenye // J. Microbiol. Meth. - 2008. - V. 72. - P.

157.

15. Жижин К.С. Медицинская статистика: учебное пособие. - Ростов н/Д: Феникс, 2007. - 160 с.

16. Гринценко В.А. Анализ взаимосвязи серорезистентности и физико-химических свойств кишечной палочки со способностью к биопленкообразованию / В.А. Гринценко, О.С. Журлов, В.В. Андрейчев // Вестник ОГУ. - 2012. - № 4 (140). - С. 201-203.

17. Гаранкина А.Ю. Регуляция способности условно-патогенных микроорганизмов к биопленкообразованию / А.Ю. Гаранкина, О.А. Капустина, О.Л. Карташова // Вестник ветеринарии. - 2011. - № 59 (4). - С. 61-63.