

Н.Ф. Тимченко¹, А.В. Раков¹, Н.А. Терентьева², Е.К. Псарева¹, А.А. Яковлев¹**ХАРАКТЕРИСТИКА СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА
ENTEROBACTERIACEAE YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS
И SALMONELLA ENTERITIDIS IN VITRO**¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Г.П. Сомова, Владивосток² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

В сравнительном аспекте с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), бактериологического и спектрометрического анализов в динамике 3 и 6 суток при температуре 20–22°C и 37°C проведены исследования биопленкообразования моно- и смешанными культурами *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*. Выявлена способность микроорганизмов сохранять жизнеспособность в этих условиях, а также формировать биопленки на абиотической поверхности. Обнаружено, что в ПЦР *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis* давали специфическую реакцию. Результаты свидетельствуют о наличии в среде в исследуемый период времени ДНК моно- и смешанных культур *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*.

Ключевые слова: *Yersinia*, *Salmonella*, биопленка, смешанные культуры.**Для цитирования:** Тимченко Н.Ф., Раков А.В., Терентьева Н.А., Псарева Е.К., Яковлев А.А. Характеристика смешанных биопленок бактерий семейства *Enterobacteriaceae Yersinia pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis in vitro*// *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2019; 1: 19–22. DOI: 10.5281/zenodo.2592503.

Для корреспонденции: Тимченко Нэлли Федоровна, e-mail: ntimch@mail.ru

Поступила 10.12.18

N.F. Timchenko¹, A.V. Rakov, N.A. Terentyeva², E.K. Psareva¹, A.A. Yakovlev**CHARACTERISTICS OF MIXED BIOFILMS OF BACTERIA
OF THE ENTEROBACTERIACEAE YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS FAMILIES
AND SALMONELLA ENTERITIDIS IN VITRO**¹ GPSomov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

In a comparative aspect, biofilm formation of mono- and mixed cultures of *Y. pseudotuberculosis* and *S. Enteritidis* was carried out using the polymerase chain reaction (PCR), bacteriological and spectrometric analyzes for 3 and 6 days at temperatures of 20–22°C and 37°C. The ability of microorganisms to maintain viability under these conditions, as well as to form biofilms on the abiotic surface, was revealed. It was found that PCR of *Y. pseudotuberculosis* and *S. Enteritidis* gave a specific reaction. The results indicate the presence of mono- and mixed cultures of *Y. pseudotuberculosis* and *S. Enteritidis* in the medium during the studied period of time.

Key words: *Yersinia*, *Salmonella*, biofilm, mixed cultures.**For citation:** Timchenko N.F., Rakov A.V., Terentyeva N.A., Psareva E.K., Yakovlev A.A. Characteristic of the mixed bacteria of the *Enterobacteriaceae* family *Yersinia pseudotuberculosis* and *S. Enteritidis in vitro*// *Health. Medical ecology. Science*. 2019; 1: 19–22 (in Russia). DOI: 10.5281/zenodo.2592503.

For correspondence: Timchenko Nelly F., e-mail: ntimch@mail.ru

Conflict of interests. The authors are declaring absence of conflict of interests.**Financing.** The study had no sponsor support.

Received 10.12.18

Accepted 25.01.19

Введение

К настоящему времени получены данные, свидетельствующие о способности микроорганизмов, в том числе возбудителей сапронозов и зоонозов, обитать в разных условиях окружающей среды, формируя при этом биопленки [11–13, 15, 17, 18]. Концепция о роли биопленок бактерий и их важности в медицине была сформулирована еще в начале 1970-х годов на осно-

вании обнаружения скоплений клеток *Pseudomonas aeruginosa* в мокроте и легочной ткани у пациентов с хроническим кистозным фиброзом (Левенгук и Пастер). Термин биопленка был введен в медицину в 1985 году J.W. Costerton [цит. по 15, 16].

В результате многочисленных исследований определено, что биопленка представляет собой сообщество одного или нескольких видов бактерий,

прикрепленных к поверхности или друг к другу и заключенных в матрикс, состоящий из экзополисахаридов, белков, внеклеточной ДНК и других веществ. Биопленка защищает бактерии от неблагоприятных абиотических и биотических факторов среды обитания. Бактерии в биопленке могут «общаться» между собой посредством секреторных интермедиаторов, которые служат основой их «социального» поведения или “Quorum Sensing” [1, 3, 4].

Известно, что микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* рода *Yersinia*, широко распространены в окружающей среде, они выделены из овощей, почвы, воды, разных видов животных и человека [8–10, 14, 16, 19, 21]. Установлено, что бактерии этого рода формируют биопленки на абиотической поверхности [2, 5–7]. В частности, патогенный вид *Y. pseudotuberculosis*, возбудитель сапронозов, способен образовывать биопленку, которая защищает его от неблагоприятных экологических условий [1, 3, 5]. Выявлено, что эти микроорганизмы в разных средах обитания (эндо- и эктотермные организмы, растения, почва, водная среда, в том числе морская) продуцируют и используют факторы патогенности с адгезивной, инвазивной, антифагоцитарной и токсической функциями [15, 20].

Другой представитель семейства *Enterobacteriaceae* рода *Salmonella* – возбудитель зоонозов *S. Enteritidis*, также формирует биопленки на разных поверхностях и при разных условиях [2, 9, 10].

Имеются данные о том, что в естественных условиях биопленки образуются чаще всего несколькими видами бактерий, а не одним [21]. Ввиду этого имеет большую фундаментальную и практическую значимость изучение, прежде всего именно таких биопленок, чем экспериментальные исследования структур, образованных одним видом микроорганизмов. В текущий период времени особый интерес представляют следующие проблемы: 1) видовой состав биопленки; 2) изучение бактериальных клеток разных видов бактерий, присутствующих в биопленке, в том числе роль клеток персистеров (а также дормантов, некультивируемых форм, которые могут составлять до 1% клеток в биопленке); 3) темпы роста клеток различных видов микробов в биопленке; 4) тип взаимоотношений между клетками разных видов бактерий (конкуренция, кооперация и т.д.), доминирование одних видов бактерий над другими в биопленке, а также факторы, чем это может быть обусловлено.

В настоящей статье представлены данные, полученные нами при исследовании формирования смешанных биопленок возбудителями сапронозов (*Y. pseudotuberculosis*) и зоонозов (*S. Enteritidis*).

Материалы и методы

В работе использованы штаммы из коллекции ФГБНУ НИИЭМ имени Г.П. Сомова: *Y. pseudotuberculosis* 696 серотип 1b (изолирован из свежей капусты

в Приморском крае РФ), 2517 серотип 03 (Mollaret, Франция), и *S. Enteritidis* S-118 (изолирован от больного в Приморском крае). Бактерии сохраняли при температуре -20°C. Для исследования предварительно *Y. pseudotuberculosis* высевали на среду 67 [11], а *S. Enteritidis* – на среду Эндо. Через 1–2 сут роста изолированные колонии пересеивали на свежий скошенный питательный агар (рН 7,2–7,3). Образцы культивировали при температуре 20–22°C.

Выявление моно- и смешанных биопленок микроорганизмов проводили, используя спектрофотометрический метод [16]. Исходная концентрация бактерий была 0,05 ОЕ/мл при 600 нм. Бактерии вносили по 200 мкл в лунки 96-луночного планшета, затем инкубировали систему при температуре 20–22°C в течение 3–6 сут. После инкубации из лунок удаляли неприкрепившиеся клетки, трижды промывали лунки 0,85% NaCl и окрашивали биопленки 0,5% кристаллическим фиолетовым (CV) в течение 20 мин при комнатной температуре. Краситель удаляли из лунок, и несвязавшийся CV отмывали водопроводной водой. Планшеты высушивали на воздухе, в каждую лунку добавляли по 200 мкл 2% уксусной кислоты в 95% этаноле и определяли оптическую плотность при 600 нм. Все эксперименты проводили в 4-кратной повторности. При статистической обработке использовали программу MS Excel 2010.

Проводили пробоподготовку для ПЦР и выделение ДНК. При этом исходную дозу бактерий перед исследованиями определяли по стандарту мутности. Для контроля результатов использовали отдельно культуры *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis* в LB бульоне (рН 7,2–7,3), посеянные с изолированных колоний на питательном агаре. В опыты взята смесь культур *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*. Все пробы культивировали при 37°C в течение 1–2 сут. Бульон кипятили в течение 5 минут при 100°C. Клетки из бульона осаждали с помощью центрифугирования в микропробирках при 3000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант переносили в новую микропробирку и использовали в качестве образца в ПЦР.

Для полимеразной цепной реакции взяты специфические праймеры на видоспецифические гены *cnf* для *Y. pseudotuberculosis* [9] и *invA* для *S. Enteritidis* [24]. Последовательности праймеров были следующими: *cnfY* 1F GTTGCAAACCTTCCGTCCCA, *cnfY* 2R ACGGCGAACTTGATAATTGCTT, *invA*-1 CAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT, *invA*-2 AGACGACTGGTACTGATCGATAAT.

Реакцию выполняли в объеме 25 мкл с использованием набора ScreenMix-HS (Евроген, Россия). В каждую пробирку добавляли: образец ДНК 1 мкл, праймеры по 1 мкл каждого, 5×реакционный буфер 5 мкл, вода до общего объема смеси 25 мкл. Проводили ПЦР в амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Программа состояла из сле-

дующих этапов: 1 цикл 94°C 5 мин, 30 циклов 94°C 1 мин, 55°C 1 мин, 72°C 1 мин и 1 цикл 72°C 5 мин. Электрофорез продуктов ПЦР вели в 1% агарозном геле (Serva Electrophoresis GmbH, ФРГ) и в трисборатном буфере. Гели окрашивали в бромистом этидии и фотографировали в УФ-свете в системе геледокументирования Bio-Rad XR (Bio-Rad Laboratories Inc., США). В качестве маркера молекулярного веса использовали PCR Markers (Promega Corp., США).

Результаты и обсуждение

При изучении динамики формирования биопленки монокультурами *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*, а также смешанными культурами на абиотической поверхности установлен рост показателей за период 3–6 сут. наблюдения (табл. 1; рис. 1). В табл. 1 приведены количественные показатели формирования биопленок *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis* при инкубации в течение 3 и 6 суток при температуре 20–22°C.

Таблица 1

Биопленки *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*

№ п/п	Моно- и смешанные культуры бактерий	A ₆₀₀	
		3 суток	6 суток
1.	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0,574±0,086	0,625±0,089
2.	<i>S. Enteritidis</i>	1,617±0,171	1,779±0,180
3.	<i>Y. pseudotuberculosis</i> + <i>S. Enteritidis</i>	1,572±0,124	1,790±0,169

Как видно из табл. 1, монокультуры *Y. pseudotuberculosis*, *S. Enteritidis* и смешанные культуры этих микроорганизмов формировали биопленки. Отмечался рост показателей биопленкообразования в течении всего срока исследований. Однако следует отметить, что к 6 сут в одинаковых условиях рост биопленки *Y. pseudotuberculosis* по сравнению с *S. Enteritidis* замедлялся более чем в три раза. Количество биопленки, образованной смешанными культурами, соответствует количеству биопленки *S. Enteritidis*. Можно предположить, что данные условия более благоприятны для роста *S. Enteritidis*.

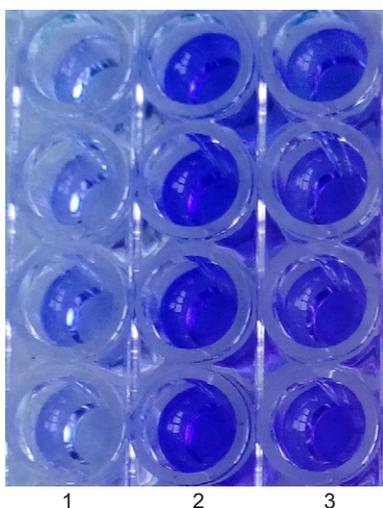


Рис. 1. Планшет с окрашенными лунками. Инкубация при 20–22°C в течение 6 суток.
1 – *Y. pseudotuberculosis*, 2 – *Y. pseudotuberculosis* + *S. Enteritidis*, 3 – *S. Enteritidis*

Нами также установлена возможность использования ПЦР при анализе бактерий в разных объектах в биопленках и вне их (рис. 2). С помощью ПЦР определено, что *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis* давали специфическую реакцию в виде полосы ДНК требуемого размера, что указывает на наличие

клеток данных микроорганизмов в смешанной биопленке и соответствующих контролях для каждого по отдельности микроорганизма (рис. 2).

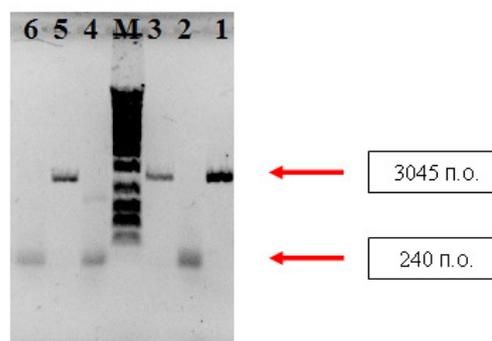


Рис. 2. Электрофорез ДНК *Y. pseudotuberculosis* (штамм 696 1b) и *S. Enteritidis* (штамм S-118) в динамике 3 и 6 сут культивирования.
1, 2 – контроли: исходные культуры *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*; 3, 5 – *Y. pseudotuberculosis* 3 и 6 сутки; 4, 6 – *S. Enteritidis* 3 и 6 сутки. М – маркер мол. массы

Таким образом, результаты, полученные с помощью разных методов исследования при температуре 20–22°C и 37°C в течение 3–6 сут, позволяют сделать вывод о том, что *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*, возбудители сапронозов и зоонозов, способны в этих условиях и периоды времени формировать смешанные биопленки.

В условиях смешанной биопленки помимо конкуренции за питательные вещества необходимо учитывать, прежде всего, нетрофические факторы, например, такие как температуру, рН среды и т.д. При изменении какого-либо параметра полученные результаты могут значительно отличаться от результатов, полученных в данной работе.

Однако в дальнейшем для количественного определения ДНК в смешанных биопленках при разных условиях сред культивирования микроорганизмов требуется продолжение изучения этого явления с помощью ПЦР в реальном времени или цифровой ПЦР. Полученные

новые результаты откроют возможность выявить в динамике доминирование в системе одного из исследованных видов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* (*Y. pseudotuberculosis* или *S. Enteritidis*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахметова Д.Г., Бердыгулова Ж.А., Евтыхова Е.Б., Шустов А.В. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности // *Биотехнология. теория и практика*. 2012; 1: 13–24.
2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий – М.: Медицина, 2005. 366 с.
3. Диденко Л.В., Константинова Н.Д., Солохина Л.В. и соавт. Ультраструктура *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе обратимого перехода в покоящееся (некультивируемое) состояние в ассоциации с сине-зелеными водорослями // *Ж. микробиол., эпидемиол, иммунобиол.* 2002. № 1. С. 17–23.
4. Псарева Е.К., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. ПЦР-система для детекции *Yersinia pseudotuberculosis* // *Мол. генетика, микробиология и вирусология*. 2018. № 2. С. 89–93.
5. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Рассказов В.А. Исследование влияния биологически активных веществ на формирование бактериальных биопленок // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014. № 3(57). С. 54–55.
6. Терентьева Н.А., Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., и др. Влияние токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на формирование биопленки // *Ж. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*, 2017, № 6. С. 37–42.
7. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* – Владивосток. 2004. 220 с.
8. Adcox H.E., Vasicek E.M., Dwivedi V. et al. *Salmonella* extracellular matrix components influence biofilm formation and gallbladder colonization // *Infect. Immun.* 2016. V 84.N 11. P. 3243–3251.
9. Almeida F.A., Pimentel-Filho N.J., Pinto U.M, et al. Acyl homoserine lactone-based quorum sensing stimulates biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis in anaerobic conditions // *Arch Microbiol.* 2017. V199. N 3, P. 475–486.
10. Atkinson S., Chang C.Y., Patrick H.L. et al. Functional interplay between the *Yersinia pseudotuberculosis* YpsRI and YtbRI quorum sensing systems modulates swimming motility by controlling expression of flhDC and fliA. *Mol. Microbiol.* 2008; 69(1): 137–151.
11. Borges KA, Furian TQ, de Souza SN, et al. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity// *Microb Pathog.* 2018; 118: 238–241.
12. Dyszel J.L., Smith J.N., Lucas D.E. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can detect acyl homoserine lactone production by *Yersinia enterocolitica* in mice // *J. Bacteriol.*, 2010. N 192. P. 29–37.
13. Gobetti M., DeAngelis M., DiCagno R. et al. Cell—cell communication in food related bacteria // *Int. J. Food Microbiol.* 2007. 120(1-2). P. 34–45.
14. Guan J, Xiao X, Xu S, et al. Roles of RpoS in *Yersinia pseudotuberculosis* stress survival, motility, biofilm formation and type VI secretion system expression // *J. Microbiol.* 2015. 53 (9): 633–642.
15. Hermans K., Roberfroid S., Thijs I.M. et al. FabR regulates *Salmonella* biofilm formation via its direct target FabB // *BMC Genomics*. 2016. N 17. P. 253–268.
16. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria // *FEMS Microbiol Rev.* 2017. 1; 41(3): 276–301.
17. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections // *APMIS*. 2017. V 125. N 4, P. 272–275.
18. Kramer A., Schwebke I., Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review // *BMC Infectious diseases*. 2006. V6. N 130. P. 1–8.
19. Leite B., Werle C.H., Carmo CPD, et al. Integration host factor is important for biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis // *Pathog. Dis.* 2017. V 75. N 6. P. 74–78.
20. Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ et al. Biofilms and host response – helpful or harmful// *APMIS*. 2017. V 125. N4. P. 320–338.
21. Yaron S., Romling U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence // *Microbial Biotechnology*. 2014. V7. N6. P. 496–516.

Сведения об авторах

Тимченко Нэнли Федоровна, д.м.н., профессор, в.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии НИИЭМ имени Г.П. Сомова, Владивосток; e-mail: ntimch@mail.ru;

Раков Алексей Владимирович, к.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярной эпидемиологии и экологии патогенных бактерий НИИЭМ имени Г.П. Сомова, Владивосток;

Псарева Екатерина Константиновна, м.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии НИИЭМ имени Г.П. Сомова, Владивосток;

Терентьева Наталья Александровна, к.б.н., с.н.с., Тихоокеанский институт биоорганической химии (ТИБОХ) ДВО РАН имени Г.Б. Елякова, Владивосток;

Яковлев Анатолий Александрович, д.м.н., лабораторией молекулярной эпидемиологии и экологии патогенных бактерий эпидемиологии НИИЭМ имени Г.П. Сомова, Владивосток.