

Влияние экзогенных протеолитических ферментов на передачу плазмидных генов в смешанных бактериальных биоплёнках

Г. В. ТЕЦ, Н. К. АРТЕМЕНКО, Н. В. ЗАСЛАВСКАЯ, К. Л. АРТЕМЕНКО, Г. Ю. КНОРРИНГ, В. В. ТЕЦ, Ю. И. СТЕРНИН

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова,
Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования

Effect of Exogenic Proteolytic Enzymes on Transfer of Plasmid Genes in Mixed Bacterial Biofilms

G. V. TETS, N. K. ARTEMENKO, N. V. ZASLAVSKAYA, K. L. ARTEMENKO, G. YU. KNORRING, V. V. TETS, YU. I. STERNIN

Academician I. P. Pavlov St.Petersburg State Medical University
St.Petersburg Academy of Postgraduate Medical Training

Изучено действие комплекса ферментов препарата Вобэнзим на передачу плазмидных генов в биоплёнках грамотрицательных бактерий. Показано, что внеклеточный матрикс бактериальных биоплёнок, содержит внеклеточную ДНК, несущую маркеры антибиотикоустойчивости. Установлено, что воздействие комплекса ферментов приводит к снижению частоты передачи генов антибиотикоустойчивости в смешанных бактериальных биоплёнках.

Ключевые слова: бактериальные биоплёнки, ферменты, гены, передача, антибиотикоустойчивость.

The effect of the enzyme complex from Vobenzin on transfer of plasmid genes in biofilms of gramnegative bacteria was studied. The extracellular matrix of the bacterial biofilms was shown to contain extracellular DNA carrying the antibiotic resistance markers. The action of the enzyme complex resulted in lower frequency of the antibiotic resistance genes transfer in mixed bacterial biofilms.

Key words: bacterial biofilms, enzymes, genes, transfer, antibiotic resistance.

Введение

Практически все бактерии и грибы, находящиеся в ротовой полости человека, образуют и входят в состав биоплёнок. Свойства бактерий внутри сообщества значительно отличаются от таковых у изолированных клеток [1–3]. Показано, что биоплёнка является идеальной нишей для обмена генетической информацией между бактериями. Трансформация в биоплёнках *Streptococcus mutans* наблюдается в 10–600 раз чаще, чем в планктонных клетках [4]. На модели биоплёнки была продемонстрирована передача между стрептококками конъюгативного транспозона, кодирующего резистентность к тетрациклину [5]. Передача генетической информации посредством конъюгации в биоплёночных культурах *Pseudomonas aeruginosa* также наблюдалась чаще, чем среди планктонных клеток [6, 7]. Отмечено, что клинически значимые штаммы бактерий, содержащие конъюгативные плазмиды, отличаются лучшей способностью формировать биоплёнки, что связано с участием F-пилей в качестве адгезивных молекул

во взаимодействии клеток с поверхностью субстрата и друг с другом [8].

В последние годы показано, что различные ферменты могут изменять свойства внеклеточного матрикса и влиять таким образом на выживаемость бактерий. Вместе с тем остается неизученной изменчивость в условиях воздействия протеаз и липаз на матрикс биоплёнок.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение возможности влияния на изменчивость бактерий за счёт действия экзогенных ферментов на бактериальные биоплёнки.

Материал и методы

Микроорганизмы. Объектом исследования служили стандартные штаммы *Escherichia coli* HB101, tetR, несущий хромосомный ген устойчивости к тетрациклину и *E.coli* DH5 alfa, pUC 19 ampR, несущие ген устойчивости к ампициллину (табл. 1). Микроорганизмы получены из музеев кафедры микробиологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова.

Питательные среды. Использованы: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), минимальная синтетическая среда M9, бульон Мюллера-Хинтон (BioMerieux), агар Мюллера-Хинтон (BioMerieux), среда LB (Sigma).

Антибиотики. В работе использованы различные природные и синтетические антибиотики: ампициллин (Hemofarm AD), тетрациклин (BioMerieux, Франция).

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 197089 С.-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8. Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова

Таблица 1. Характеристика использованных микроорганизмов

№ н.о.	Длина последовательности нуклеотидов (п. н.)	Температура отжига (°C)	Последовательность
<i>E.coli</i> HB101.			
Ген хромосомной устойчивости к тетрациклину — tetA.			
Прямой праймер	869	20	59.98
Обратный праймер	1077	20	59.80
<i>E.coli</i> DH5α /pUC19.			
Плазмида pUC19 размер: 2.6(kb) = 2686 bp.			
Прямой праймер	151	20	59.97
Обратный праймер	308	20	60.00

Примечание. Для подбора праймеров использовали программу Primer3 — http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.

Ферментные препараты. Вобэнзим (Мукос Фарма, Германия).

Определение жизнеспособности бактерий. Жизнеспособность бактерий оценивали, определяя методом серийных разведений число колониеобразующих единиц (КОЕ). Для этого готовили последовательные десятикратные разведения в физиологическом растворе, высевали на агаризованную среду по 0,1 мл, после чего инкубировали при 37°C и подсчитывали количество выросших колоний.

Получение бактериальных биоплёнок в чашках Петри. В чашки Петри (D=40 мм) вносили по 0,8 мл взвеси бактерий в конечной концентрации (5×10^8 КОЕ), инкубировали 3 часа при 37°C и после этого добавляли по 2 мл свежей среды. Чашки Петри выдерживали 24 часа при 37°C, а затем ферменты вносили или сразу, или через 24 часа. После инкубации с препаратами при 37°C содержимое чашек сливали, промывали 1 мл фосфатного буфера, добавляли 0,5 мл свежей среды и механически соскабливали биоплёнку. Жизнеспособность бактерий оценивали, определяя КОЕ. В качестве контроля использовали биоплёнку, образованную бактериями, без обработки её ферментами.

Выявление передачи плазмидных генов антибиотикоустойчивости. Для передачи плазмидных генов антибиотикоустойчивости совместно выращивали штаммы *E.coli*, устойчивые к тетрациклину и ампициллину, на средах без антибиотика. Полученные смешанные сообщества ресуспендировали в изотоническом растворе хлорида натрия, и высевали на среды, содержащие отдельно тетрациклин или ампициллин и тетрациклин с ампициллином. Учёт результата проводили в течение 72 часов. В опытные образцы ферменты добавляли согласно схеме опыта.

Статистические методы. Полученные количественные данные были обработаны с использованием методов вариационной статистики. Наряду со средним арифметическим значением (M) вычисляли величины среднеквадратичной ошибки (σ), определяли доверительные границы выборочного параметра. Далее при представлении количественных данных приводятся значения $M \pm \sigma$. Достоверность различий оценивали, используя t -критерий Стьюдента при пороге доверительной вероятности 0,97 [9].

Результаты исследования

Для проведения экспериментов были созданы 2 штамма: *E.coli* HB101, tetR, несущий хромосомный ген устойчивости к тетрациклину, и *E.coli* DH5 α, pUC 19 ampR, несущий ген устойчивости к ампициллину.

Для проверки штаммов и последующего поиска переданных генов методом полимеразной

цепной реакции были созданы праймеры для соответствующих генов.

Для определения частоты передачи плазмидных генов использовали полученные штаммы микроорганизмов: *E.coli* HB101, tetR, и *E.coli* DH5 α, pUC 19 ampR. В качестве маркерного признака оценена передача плазмидных генов устойчивости к ампициллину. Оценка передачи устойчивости признака в биоплёнках после 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч инкубации в присутствии Вобэнзима и без него в качестве контроля.

В ходе экспериментов оценивали:

а) выявление передаваемых признаков в генах ДНК матрикса;

б) определение количества живых бактерий биоплёнки (число колониеобразующих единиц, КОЕ);

в) определение числа бактерий, получивших новый признак за счёт пересева на дифференциально-диагностические среды с антибиотиками;

г) выделение ДНК;

д) электрофорез и выявление соответствующих генов методом ПЦР.

Для проведения запланированных экспериментов была выполнена проверка образования смешанных биоплёнок штаммами, созданными для данного исследования. В ходе проведённого испытания установлено, что смешанные биоплёнки образуются в заданных условиях при их формировании бактериями, взятыми в посевной дозе в $2 - 5 \times 10^9$ в соотношении 1:1.

Выявление передаваемого признака в генах ДНК матрикса. Смешанные 24-часовые биоплёнки получали на дне 9 см стеклянных чашек Петри. Матрикс и клетки разделяли центрифугированием при 9000 g в течение 30 мин. Из матрикса выделяли ДНК фенол-хлороформным методом, и после электрофореза в материале полосы ДНК по размеру, соответствующей плазмиде данного штамма, определяли наличие плазмидных генов методом ПЦР. В результате установлено, что плазмида штамма *E.coli* DH5 α, pUC 19, ampR

Таблица 2. Передача плазмидных генов в присутствии Вобэнзима

Время инкубации с ферментом (в часах)	Доза Вобэнзима (мг/л)									
	0		5		10		50		100	
	КОЕ	число реком- бинантов	КОЕ	число реком- бинантов	КОЕ	число реком- бинантов	КОЕ	число реком- бинантов	КОЕ	число реком- бинантов
24	$(9,8 \pm 0,6) \times 10^8$	8 $\pm$ 2	$(9,9 \pm 0,5) \times 10^8$	7 $\pm$ 3	$(9,7 \pm 0,5) \times 10^8$	8 $\pm$ 3	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^9$	4 $\pm$ 2	$(9,0 \pm 0,6) \times 10^8$	4 $\pm$ 2
48	$(9,6 \pm 0,2) \times 10^8$	8 $\pm$ 3	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^9$	9 $\pm$ 3	$(9,9 \pm 0,4) \times 10^8$	10 $\pm$ 3	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^9$	4 $\pm$ 2	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^9$	4 $\pm$ 2
72	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^9$	10 $\pm$ 3	$(9,9 \pm 0,4) \times 10^8$	8 $\pm$ 3	$(9,4 \pm 0,2) \times 10^8$	8 $\pm$ 2	$(9,9 \pm 0,4) \times 10^8$	3 $\pm$ 2	$(9,6 \pm 0,4) \times 10^8$	3 $\pm$ 1
96	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^9$	8 $\pm$ 2	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^9$	9 $\pm$ 2	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^9$	9 $\pm$ 3	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^9$	5 $\pm$ 1	$(9,7 \pm 0,6) \times 10^8$	4 $\pm$ 2
120	$(9,8 \pm 0,6) \times 10^8$	6 $\pm$ 3	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	6 $\pm$ 2	$(9,5 \pm 0,5) \times 10^8$	7 $\pm$ 3	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^9$	4 $\pm$ 2	$(9,6 \pm 0,5) \times 10^8$	3 $\pm$ 2
144	$(9,6 \pm 0,6) \times 10^8$	8 $\pm$ 2	$(9,4 \pm 0,6) \times 10^8$	5 $\pm$ 3	$(9,8 \pm 0,2) \times 10^8$	8 $\pm$ 2	$(9,6 \pm 0,4) \times 10^8$	4 $\pm$ 1	$(9,0 \pm 0,3) \times 10^8$	4 $\pm$ 1
168	$(9,9 \pm 0,2) \times 10^8$	9 $\pm$ 3	$(1,0 \pm 0,6) \times 10^9$	8 $\pm$ 3	$(9,4 \pm 0,6) \times 10^8$	7 $\pm$ 2	$(9,2 \pm 0,6) \times 10^8$	3 $\pm$ 1	$(9,4 \pm 0,3) \times 10^8$	3 $\pm$ 1

присутствует во внеклеточном матриксе смешанных бактериальных биоплёнок, может быть выделена из него и идентифицирована методом ПЦР (табл. 2).

Выявлено, что при действии высоких концентраций Вобэнзима на биоплёнки различного возраста происходит изменение числа выявления рекомбинантов антибиотикоустойчивости. При этом число рекомбинантов снижается в 2 раза. По данным молекулярного анализа происходит передача плазмиды, контролирующей устойчивость к ампициллину, к штамму, несущему ген устойчивости к тетрациклину.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют, что ферменты, входящие в состав Вобэнзима, воздействуют на свойства смешанных микробных биоплёнок. Эти данные соответствуют ранее полученным результатам об универсальности действия различных ферментов, когда объектом воздействия являются не собственно бактерии, а компоненты внеклеточного матрикса биоплёнок

[10, 11]. Присутствие плазмид и мутантных генов, контролирующих антибиотикоустойчивость, не делают бактериальные биоплёнки устойчивыми к воздействию использованных ферментов. В матриксе смешанных биоплёнок обнаружена внеклеточная ДНК, несущая использованные маркерные гены антибиотикоустойчивости. Так, во внеклеточном матриксе смешанных бактериальных биоплёнок выявлена плаزمиды штамма *E.coli* DH5 alfa, pUC 19, ampR. При действии ферментов, входящих в состав Вобэнзима, зарегистрировано уменьшение количества внеклеточного матрикса, что очевидно снижает эффективность передачи генов между бактериями биоплёнок. При этом установлено статистически значимое снижение частоты передачи плазмидных генов антибиотикоустойчивости в бактериальных биоплёнках использованных штаммов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности влиять на частоту передачи плазмидных генов антибиотикоустойчивости в бактериальных биоплёнках с помощью ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

- Ghannoum M., O'Toole G. A., eds. Microbial Biofilms. Washington: ASM Press; 2004. p. 478.
- Тец В. В. Бактериальные биоплёнки. Антимикробная терапия. Consilium medicum. 2007; Экстравыпуск: 13—15.
- Tetz V. V., Korobov V. P., Artemenko N. K. et al. Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities. Biofilms 2004; 1—7.
- Li Y. H., Lau P. C., Lee J. H. et al. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. J Bacteriol 2001; 183: 897—908.
- Hausner M., Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. Applied Environmental Microbiol 1999; 65: 3710—3713.
- Roberts A. P., Cheah G., Ready D. et al. Transfer of Tn916-like elements in microcosm dental plaques. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2943—2946.
- Thoma C. M., Nielsen K. M. Mechanisms of and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. Nature Rev 2005; 3: 711—721.
- Ghigo J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature 2001; 25; 413: 6858: 772.
- Монцевичуте-Эрингене Е. В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе. Патол Физиол Экспер Тер 1964; 4: 71—78.
- Тец В. В., Кнорринг Г. Ю., Артеменко Н. К. и соавт. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии. Антибиотики и химиотер 2004; 12: 3—6.
- Tetz G. V., Artemenko N. K., Tetz V. V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 1204—1209.