

## Биоплёнообразование энтерококками кишечной микрофлоры животных

**Н.Е. Щепитова**, аспирантка,  
ФГБОУ ВПО Оренбургский ГАУ

Микроорганизмы рода *Enterococcus* входят в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта млекопитающих и характеризуются невысокой патогенностью. Они обеспечивают колонизационную резистентность слизистых оболочек макроорганизма, стимулируют местный гуморальный и клеточный иммунитет, а также участвуют в метаболических реакциях (гидролиз сахаров, синтез витаминов, деконъюгирование жёлчных кислот) [1]. Однако при снижении активности факторов врождённого иммунитета кишечник может стать основным источником транслокации бактерий при эндогенной энтерококковой инфекции.

Одной из основных стратегий длительного сохранения и выживания бактерий в экотопе является формирование биоплёночных структур, представляющих собой скопление микроорганизмов, ассоциированных с полисахаридным внеклеточным матриксом и фиксированных на биотических или абиотических поверхностях [4]. Образование энтерококками биоплёнок в большинстве случаев рассматривается как важный фактор их патогенности при развитии энтерококковых инфекций. В то же время способность формировать биоплёнки обеспечивает микроорганизмам определённые преимущества при колонизации биотопа, поэтому данный признак может быть использован как один из критериев при отборе штаммов для биопрепаратов пробиотической направленности [2].

Накоплен значительный материал по способности патогенных микроорганизмов образовывать биоплёнки. Между тем сведения об этом свойстве у представителей нормальной микрофлоры, в том числе энтерококков кишечной микробиоты животных, практически отсутствуют. **Цель** настоящего исследования – определение возможности образования биоплёнок бактериями рода *Enterococcus*, выделенными из кишечника животных.

**Материалы и методы исследования.** Материалом для исследования явился 51 штамм энтерококков, выделенных из фекалий клинически здоровых сельскохозяйственных животных. Из них 18 штаммов выделены из фекалий крупного рогатого скота, 16 – из фекалий свиней, 10 – из фекалий лошадей, 7 – из фекалий коз.

Бактерии выделяли путём посева испражнений в разведениях  $10^{-3}$ – $10^{-6}$  на жёлчно-эскулиновый агар с азидом натрия (HiMedia, Индия). При обнаружении роста, характерного для энтерококков (образование коричнево-чёрного преципитата вокруг колоний), проводили пересев колоний на Schaedler-агар (HiMedia, Индия).

Видовую идентификацию, а также определение наличия гена *esp*, кодирующего синтез поверхностного белка энтерококков, осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением известных праймеров (табл.) [5, 6]. Синтез праймеров осуществлён компанией «СИН-ТОЛ» (г. Москва).

Для постановки ПЦР бактериальные лизаты получали с помощью реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» («Литех», Россия). ПЦР проводили в термоциклере

Праймеры, использованные для обнаружения генов энтерококков

Продукт	Ген	Последовательность 5'–3'	Размер продукта реакции, п.о.
Супероксиддисмутаза <i>E. casseliflavus</i>	sodA CA	TCCTGAATTAGGTGAAAAAC GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	288
Супероксиддисмутаза <i>E. durans</i>	sodA DU	CCTACTGATATTAAGACAGCG TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295
Супероксиддисмутаза <i>E. faecalis</i>	sodA FL	ACTTATGTGACTAACTTAACC TAATGGTGAATCTTGGTTGG	360
Супероксиддисмутаза <i>E. faecium</i>	sodA FM	GAAAAACAATAGAAGAATTAT TGCTTTTTTGAATCTTCTTTA	215
Супероксиддисмутаза <i>E. flavescens</i>	sodA FV	GAATTAGGTGAAAAAAGTT GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	284
Супероксиддисмутаза <i>E. gallinarum</i>	sodA GA	TTACTTGCTGATTTTGATTCG TGAATCTTCTTTGAAATCAG	173
Супероксиддисмутаза <i>E. hirae</i>	sodA HI	CTTTCTGATATGGATGCTGTC TAAATCTTCTTAAATGTTG	187
Супероксиддисмутаза <i>E. malodoratus</i>	sodA MA	GTAACGAACCTTGAATGAAGTG TTGATCGCACCTGTTGGTTTT	134
Поверхностный белок <i>Esp</i>	esp	AGATTTTCATCTTTGATTCTTAG AATTGATCTTTAGCATCTGG	510

«Терцик» (ДНК-технология, Россия). Реакционная смесь включала бактериальный лизат (1 мкл), специфические праймеры (по 1 мкл), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, буфер, фермент Taq-полимеразу, хлорид магния. Реакционную смесь доводили до 25 мкл водой без нуклеаз.

Для обнаружения видоспецифических генов, кодирующих синтез супероксиддисмутазы, в смесь для мультиплексной ПЦР добавляли 1 мкл каждого праймера, осуществляли амплификацию фрагмента ДНК по протоколу: 1 цикл – 92°C, 4 мин.; 30 циклов – 92°C в течение 30 с, 1 мин. при 55°C (для групп 1,2) или 60°C (для группы 3), 1 мин. при 72°C; 1 цикл элонгации при 72°C в течение 7 мин. Протокол амплификации гена *esp* содержал: 1 цикл при t 92°C, 3 мин.; 5 циклов – 92°C, 5 с, 59°C, 5 с, 72°C, 5 с; 25 циклов – 1 мин. при 92°C, 1 мин. при 59°C, 1 мин. при 72°C; последний цикл включал 20 с при 92°C, 1 мин. – 59°C и элонгацию в течение 10 мин. при 72°C.

Продукты амплификации генов анализировали путём электрофоретического разделения в горизонтальном агарозном геле (1–2%), окрашенном бромистым этидием. В качестве маркеров применяли GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Плотность агарозного геля и маркеры молекулярного веса подбирали в зависимости от молекулярной массы продуктов амплификации. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете. Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определённой массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

Образование биоплёнок микроорганизмами оценивали по степени связывания ими кристаллического фиолетового в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах [7]. Оптическую плотность (A) измеряли при длине волны 492 нм. Коэффициент биоплёнкообразования (КБ) рассчитывали как отношение  $A_{492, \text{опыт}}/A_{492, \text{контроль}}$ , положительными считали значения более 1,1.

Полученные в ходе исследований данные были обработаны статистически [3].

**Результаты исследований.** В результате проведённой идентификации 13 выделенных штаммов были отнесены к виду *Enterococcus hirae*, по 12 изолятов – к видам *E. faecium* и *E. durans*, 7 культур –

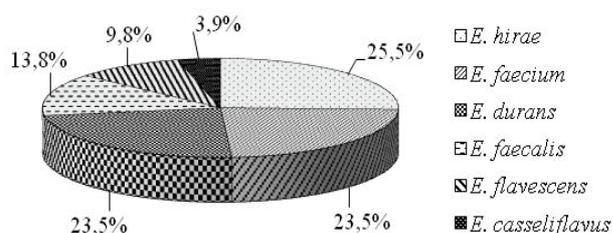


Рис. 1 – Видовой состав энтерококков кишечной микрофлоры животных

к виду *E. faecalis*, 5 штаммов – к виду *E. flavescens* и 2 штамма – к виду *E. casseliflavus* (рис. 1).

Среди культур, изолированных из фекалий свиней, большинство штаммов относились к видам *E. faecium* (50,0%) и *E. hirae* (37,4%) (рис. 2). В единичных случаях выделялись штаммы *E. casseliflavus* (6,3%) и *E. durans* (6,3%).

Видовой состав энтерококков микрофлоры фекалий лошадей был представлен в 40,0% случаев видом *E. faecium*, в 30,0% – *E. flavescens*, в 20,0% – *E. hirae*, в 10,0% – *E. casseliflavus*. Изоляты энтерококков из фекалий крупного рогатого скота принадлежали к видам *E. durans* (61,1%), *E. faecalis* (33,4%) и *E. flavescens* (5,5%). Доминирующим видом энтерококков, выделенных из фекалий коз, был *E. hirae* (71,4%), по одному штамму идентифицировано как *E. flavescens* (14,3%) и *E. faecalis* (14,3%).

На следующем этапе работы была охарактеризована способность энтерококков кишечной микрофлоры животных образовывать биоплёнки.

Установлено, что 21,5±5,75% штаммов формировали плёнки на абиотической поверхности. Культуры *E. faecium* обладали данной способностью в 50% случаев, штаммы *E. hirae* и *E. durans* – в 15,3±9,98 и 16,6±10,74% случаев соответственно. Количество биоплёнкоформирующих штаммов *E. flavescens* составило 20,0±17,88% (рис. 3).

Коэффициент биоплёнкообразования изолятов энтерококков варьировал от 1,2 до 1,4. Для штаммов *E. faecium* средний КБ составил 1,3±0,04, а для культур *non-faecium* видов – 1,2±0,02.

Наибольший процент штаммов, формирующих биоплёнки, был выделен от лошадей (36,4±14,50%) и свиней (27,2±13,41%). В одинаковом проценте случаев биоплёнкообразующие культуры изолированы от крупного рогатого скота и коз (18,2±11,63%).

Известно, что поверхностный белок энтерококков, кодируемый геном *esp*, участвует в образовании

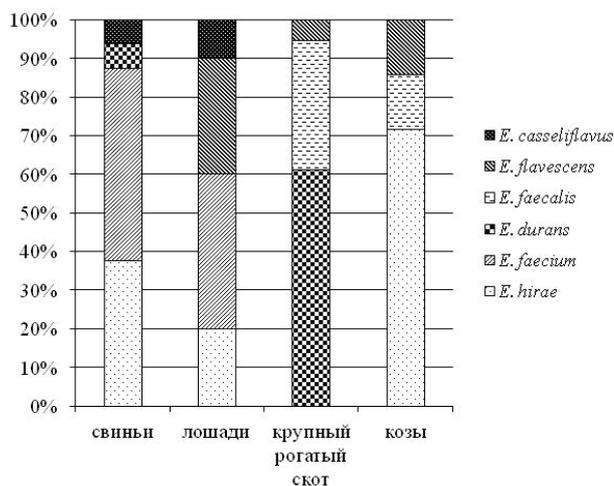


Рис. 2 – Видовой состав фекальных энтерококков животных

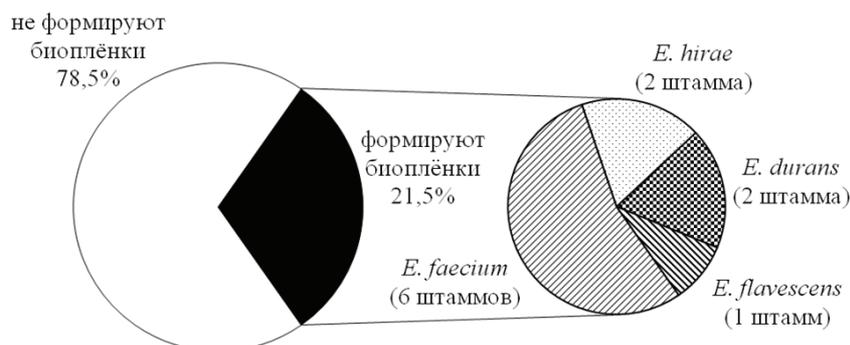


Рис. 3 – Способность к биоплёнкообразованию *Enterococcus* sp.

биоплёнок на абиотических поверхностях [8]. Ни у одного из изученных штаммов ген *esp* не обнаружен.

**Вывод.** Выявлено, что *Enterococcus* sp. фекальной микрофлоры обладают способностью образовывать биоплёнки, причём это свойство характерно для разных представителей данного рода.

Полученные данные расширяют представления об арсенале биологических свойств энтерококков, способствующих длительному переживанию последних в кишечном биотопе.

#### Литература

1. Бондаренко В.М., Суворов А.Н. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. М.: Медицина, 2007. 30 с.
2. Хмель И.А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 457–464.
3. Ашмарин И.П., Воробьёв А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. 180 с.
4. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // Nature Reviews Microbiology. 2010. No 8. P. 623–633.
5. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci // Journal of Clinical Microbiology. 2004. Vol. 42. No. 8. P. 3558–3565.
6. Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C. et al. Development of Multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium* // Journal of Clinical Microbiology. 2004. No. 42. P. 4473–4479.
7. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // Annual Review of Microbiology. 2000. No. 54. P. 49–79.
8. Heikens E., Bonten M.J., Willems R.J. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162 // Journal of Bacteriology. 2007. No. 189 (22). P. 8233–8240.