

УДК 579.861.2

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ НА АДГЕЗИЮ И ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНК БАКТЕРИЯМИ STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

Ерошенко Д.В., Коробов В.П.

ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения  
Российской академии наук, Пермь, e-mail: [dasha.eroshenko@gmail.com](mailto:dasha.eroshenko@gmail.com)

Исследовано влияние ионов кальция, магния, цинка и марганца на адгезию и образование биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis*. Показано, что ионы кальция (2,5 мМ) ингибируют адгезию бактерий *S. epidermidis* GISK 33 к полистиролу на 37 ± 10% и образование биопленок бактериями *S. epidermidis* GISK 33 и *S. epidermidis* ATCC 12228 на 46–54%. Внесение в среду ионов цинка (2,5 мМ) подавляет как адгезию (на 85–97%), так и образование биопленок (на 37–50%) для всех исследованных штаммов *S. epidermidis*. Установлено, что увеличение концентрации катионов Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> в среде инкубации от 0,05 до 2,5 мМ для штамма *S. epidermidis* GISK 33 сопровождается ингибированием процессов бактериальной колонизации. Обнаруженные изменения, возможно, связаны с изменением электрокинетических характеристик бактериальных клеток, в частности дзета-потенциала.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus epidermidis*, адгезия, кальций, магний, цинк, марганец, дзета-потенциал

## THE EFFECTS OF CALCIUM, MAGNESIUM, ZINC, AND MANGANESE ON THE ADHESION AND BIOFILM FORMATION OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

Eroshenko D.V., Korobov V.P.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS,  
Perm, e-mail: [dasha.eroshenko@gmail.com](mailto:dasha.eroshenko@gmail.com)

The effects of increasing concentrations of the divalent ions calcium, magnesium, zinc, and manganese on the adhesion and the biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene were studied. The 2,5 mM of calcium in the medium caused the adhesion decrease by 37 ± 10% for one of the three strains of *S. epidermidis*, and the biofilm formation reduction by 46–54% for two of the three strains. Adding of 2,5 mM zinc decreases both adhesion to 85–97% and the biofilm formation to 37–50% for all tested strains of *S. epidermidis*. With increasing concentration of cations Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> in the medium from 0 to 2,5 mM inhibition of bacterial colonization for the *S. epidermidis* 33 strain was observed. The introduction of metal ions in the medium is accompanied by a change in the zeta potential of *S. epidermidis* bacterial cells.

**Keywords:** *Staphylococcus epidermidis*, adhesion, calcium, magnesium, zinc, manganese, zeta potential

Бактерии вида *Staphylococcus epidermidis* являются частью нормальной микрофлоры кожи и слизистых человека и животных [1]. Однако, согласно последним данным, коагулазонегативные стафилококки, к которым относятся бактерии вида *S. epidermidis*, занимают лидирующее положение среди всех инфекций (15,3%), а при попадании их в кровоток обуславливают до 34,1% инфекционных осложнений, связанных с центральными венозными катетерами [7]. Ключевым этапом в развитии этих инфекций является адгезия бактерий к поверхности использованных имплантатов [13].

Известно, что факторы среды, в том числе её состав, оказывают существенное влияние на бактериальную адгезию. Однако до сих пор остается неясной конкретная роль ионов двухвалентных металлов в процессах адгезии бактериальных клеток. Известно, что ионы кальция вызывают зависимость от их концентрации ингибирование

образования биопленок бактерий *S. aureus* [11], а присутствие в среде ионов магния и кальция в концентрации до 128 мМ значительно усиливает продукцию внеклеточных полимеров и образование биопленок клиническими изолятами *S. epidermidis* [6].

В связи с этим целью настоящего исследования была оценка процессов адгезии и образования биопленок бактериями *S. epidermidis* при изменении содержания в среде ионов кальция, магния, цинка и марганца.

### Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали три штамма бактерий вида *S. 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 (13000 об/мин, 5 мин), осадки дважды промывали 0,14 М NaCl и ресуспендировали в среде LB без KCl, содержащей ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в концентрации 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 и 2,5 мМ или 2,5 мМ ЭДТА до конечного содержания бактерий  $10^7$  КОЕ/мл. В контрольных экспериментах использовали суспензии бактерий в среде LB без внесения катионов.

Адгезивные свойства бактерий оценивали в полистироловых чашках Петри (40 мм, «Медполимер», Россия) после инкубации при 37°C в течение 30 мин [2]. Количество связавшихся с поверхностями полистирола бактерий оценивали прямым подсчетом клеток в поле зрения с помощью микровизора «µViso-103» (Россия) после окрашивания их водным раствором кристаллического фиолетового (0,1%), учитывая не менее 10 полей зрения при увеличении  $\times 2500$ .

Биопленкообразующую способность бактерий *S. epidermidis* в присутствии ионов металлов определяли классическим методом выращивания в ячейках 96-луночного плоскодонного планшета с последующим отделением планктонных клеток и окрашиванием биопленок 0,1% раствором кристаллического фиолетового. Связавшийся краситель экстрагировали 96% этанолом и оптическую плотность полученных экстрактов измеряли на планшетном ридере «Biorad» (США) при 570 нм [12].

Дзета-потенциал бактериальных клеток определяли на лазерном анализаторе размера частиц и дзета-потенциала Zetasizer NanoZS («Malvern», Великобритания) методом динамического светорассеяния под углом 90° по изменению распределения частиц в электрическом поле. Бактерии, выращенные и подготовленные, как описано выше, суспендировали

до концентрации  $10^7$  КОЕ/мл в питательной среде LB без KCl, содержащей ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  в концентрации 2,5 мМ. Измерения проводили при 37°C в течение 30 мин.

### Результаты исследования и их обсуждение

Полученные экспериментальные данные показали, что повышение концентрации ионов кальция в среде культивирования до 2,5 мМ снижает количество сорбированных клеток только штамма *S. epidermidis* 33, а интенсивность формирования биопленок – почти в 2 раза для штаммов *S. epidermidis* 33 и *S. epidermidis* 12228 (рис. 1). Обнаружено, что ионы цинка в концентрации 2,5 мМ оказывают ингибирующий эффект как на адгезию, так и образование биопленок всех исследованных штаммов *S. epidermidis*. При этом влияние ионов цинка наиболее ярко проявлялось на первых этапах образования биопленок в связи с тем, что число сорбированных клеток снижалось на 85–97%, тогда как образование биопленок в этих условиях снижалось менее выражено – на 37–50%. Однако недостаток свободных ионов кальция и цинка, образующийся при добавлении в среду комплексообразователя (ЭДТА), также приводит к снижению сорбционных характеристик бактерий всех штаммов.

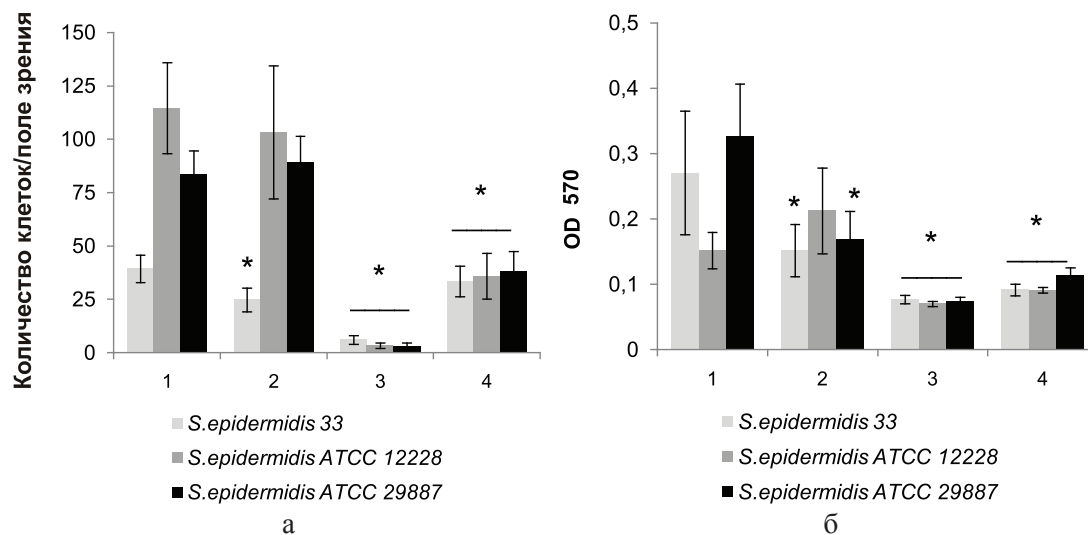


Рис. 1. Влияние ионов кальция (2,5 мМ), цинка (2,5 мМ) и ЭДТА (2,5 мМ) в среде LB на адгезию (а) и образование биопленок (б) бактериями *S. epidermidis*

Результаты детального исследования адгезии и образования биопленок бактериями штамма *S. epidermidis* 33 при внесении в среду инкубации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в диапазоне концентраций от 0 до 2,5 мМ представлены на рис. 2. По-

лученные данные свидетельствуют о том, что увеличение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в среде культивирования до 0,5 мМ приводило к небольшому повышению образования биопленок (рис. 2, а, г). Дальнейший рост содержания этих ионов в среде

оказывал ингибирующий эффект на процесс формирования биопленок.

Важно отметить, что возрастание содержания в среде ионов  $Mg^{2+}$  до 2,5 мМ повышает биопленкообразующую активность бактерий примерно в 2 раза (рис. 2, б). В то же время присутствие в среде ионов  $Zn^{2+}$  оказывает ингибирующее действие на

формирование биопленок, начиная с минимальной исследованной концентрации (0,05 мМ) (рис. 2, в).

В отличие от процессов биопленкообразования, адгезия бактериальных клеток в значительной мере снижается при внесении в среду всех исследованных в работе катионов, начиная с концентрации 0,5–1,0 мМ.

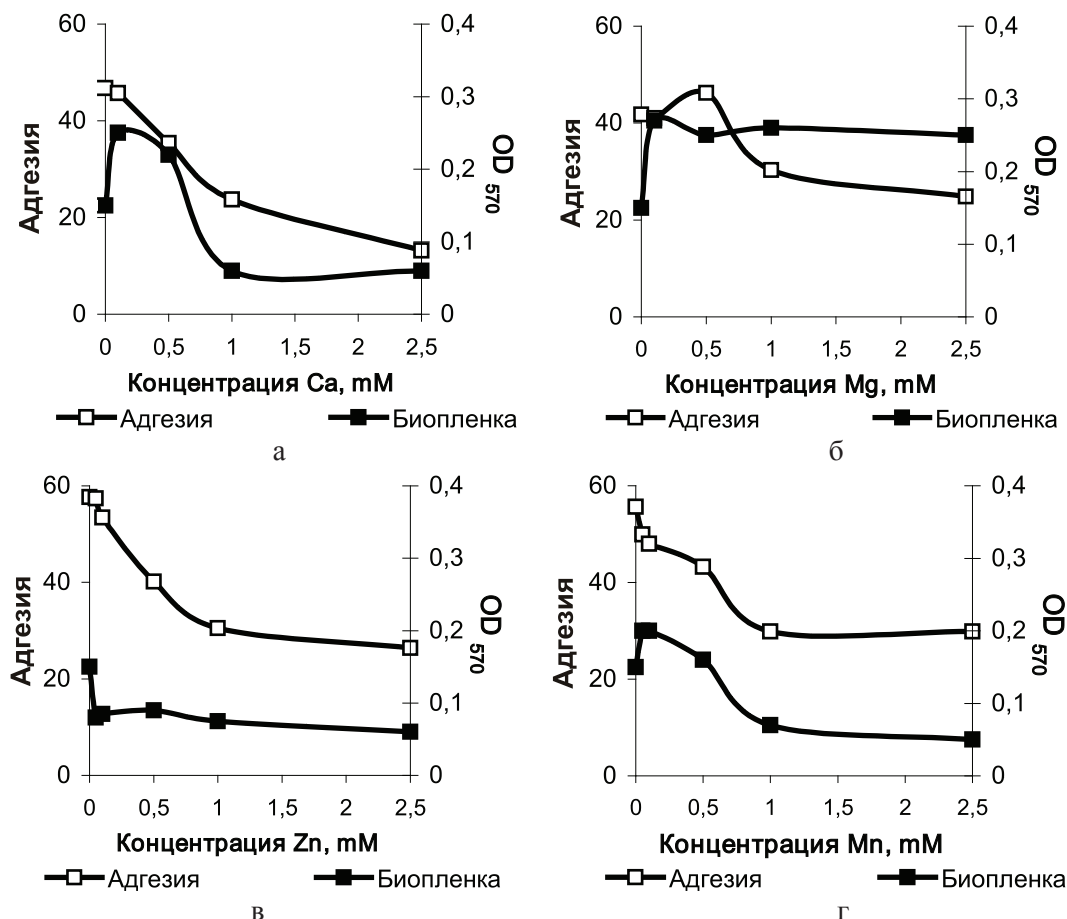


Рис. 2. Влияние концентрации ионов металлов  $Ca^{2+}$  (а),  $Mg^{2+}$  (б),  $Zn^{2+}$  (в),  $Mn^{2+}$  (г) в среде LB на адгезию и образование биопленок бактериями *S. epidermidis* 33.

Выраженное ингибирование образования биопленок бактерий *S. epidermidis* 33 при введении в среду роста ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  может быть связано с активацией внеклеточных протеолитических ферментов [8], которая приводит к дефициту полноценных белковых компонентов, необходимых для построения матрикса формирующихся биопленок коагулазонегативных стафилококков [9].

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что ионы кальция и марганца способны ингибировать адгезию к полистиролу, межклеточную адгезию и образование Вар-зависимых биопленок бактериями *S. aureus* [4]. По-

видимому, это обусловлено комплексообразованием ионов кальция с белком Вар через специфический EF-мотив данного белка, так как показано, что после образования такого комплекса бактерии теряют способность к межклеточной адгезии и тем самым к образованию биопленок [4]. Можно предположить, что подобный эффект характерен и для бактерий *S. epidermidis*, для которых белковые компоненты являются основным компонентом межклеточного матрикса формируемых биопленок.

Кроме того, известно, что в процессах адгезии стафилококков к поверхности полистирола принимают участие белки

клеточной стенки Aap и SasG, имеющие специфические Zn-связывающие домены [5]. В связи с этим можно предположить, что избыток ионов цинка способен оказывать влияние на уровень гидрофобности клеточной стенки бактерий и тем самым вызывать снижение количества сорбированных клеток. Ионы марганца, возможно, связываясь с этими белками не специфически, могли блокировать их основные функции и тем самым заметно снижать способность клеток стафилококков к сорбции на поверхности полистирола.

Важно отметить, что имеющиеся в составе клеточной стенки грамположительных бактерий белки, экзополисахариды и липотейхоевые кислоты способны связывать ионы кальция [3]. Такое неспецифическое связывание металлов с поверхностными структурами бактерий может сопровождаться изменением электростатических свойств клеток. Действительно, результаты исследования влияния двухвалентных катионов на дзета-потенциал бактерий *S. epidermidis* 33 подтвердили предположение об изменении отрицательного заряда бактериальных клеток в их присутствии (таблица). Максимальный эффект на величину дзета-потенциала оказывают ионы магния, изменяя потенциал клеток почти на 30%, менее выражено – ионы кальция и цинка (на 20 и 18% соответственно). Наименьшее влияние на величину дзета-потенциала оказывали ионы двухвалентного марганца, вызывая снижение его величины лишь на 7%.

Дзета-потенциал клеток *S. epidermidis* 33 в среде LB, содержащей ионы двухвалентных металлов

Среда	Дзета-потенциал, mV
Контроль	-21,0 ± 0,4
LB + 2,5 мМ Mg <sup>2+</sup>	-14,5 ± 1,0*
LB + 2,5 мМ Ca <sup>2+</sup>	-16,7 ± 0,7*
LB + 2,5 мМ Zn <sup>2+</sup>	-17,3 ± 0,6*
LB + 2,5 мМ Mn <sup>2+</sup>	-19,5 ± 0,8*

Примечание. \* достоверное отличие от контроля ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, присутствие двухвалентных катионов в среде оказывает влияние на адгезию бактерий *S. epidermidis*, по-видимому, двумя путями: специфическим связыванием с белковыми молекулами и неспецифическим связыванием с отрицательно-заряженными группировками на поверхности бактериальных клеток, приводящее к изменению дзета-потенциала клеток.

## Заключение

Известно, что двухвалентные катионы способны ингибировать образование биопленок бактериями вида *S. aureus* [11] и усиливать образование этих структур бактериями вида *S. epidermidis* [6; 10]. Однако результаты наших исследований показали, что влияние двухвалентных катионов как на сорбцию, так и на образование биопленок изученными нами штаммами *S. epidermidis* в большой степени зависит от концентрации ионов в среде инкубирования (рис. 1). При этом повышение содержания в среде одного из катионов Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> до 2,5 мМ в большинстве случаев приводит к ингибированию процессов бактериальной колонизации. Наиболее вероятным механизмом действия ионов металлов на адгезию бактерий *S. epidermidis* является изменение дзета-потенциала бактерий (таблица), ослабляющее их взаимодействие с атакуемой поверхностью.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-00687), а также Министерства образования и науки Пермского края по реализации научных проектов международными исследовательскими группами ученых (соглашение № С-26/632).

## Список литературы

1. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. – Екатеринбург: УрО РАН, 2000. – 239 с.
2. 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.
3. Потехина Н.В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грам-положительных бактерий // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 225–278.
4. Arrizubieta M.J., Toledo-Arana A., Amorena B., Penadés J.R., Lasa I. Calcium inhibits bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus* // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – № 22. – P. 7490–7498.
5. Conrady D.G., Brescia C.C., Horii K., Weiss A.A., Hassett D.J., Herr, A.B. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – Vol. 105. – № 49. – P. 19456–19461.
6. Dunne Jr.W., Burd E. The effects of magnesium, calcium, EDTA, and pH on the in vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic // Microbiol. Immunol. – 1992. – Vol. 36. – № 10. – P. 1019–1027.
7. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 // Infect. Control Hosp. Epidemiol. – 2008. – Vol. 29. – № 11. – P. 996–1011.
8. Gossas T., Danielson U.H. Characterization of Ca<sup>2+</sup> interactions with matrix metalloproteinase-12: implications for

matrix metalloproteinase regulation // *Biochem. J.* – 2006. – Vol. 398. – P. 393–398.

9. Götz F. Staphylococcus and biofilms // *Molecular Microbiology.* – 2002. – Vol. 43. – № 6. – P. 1367–1378.

10. Ozerdem Akpolat N., Elçi S., Atmaca S., Akbayin H., Gül K. The effects of magnesium, calcium and EDTA on slime production by Staphylococcus epidermidis strains // *Folia Microbiol. (Praha).* – 2003. – Vol. 48. – № 5. – P. 649–653.

11. Shukla S.K., Rao T.S. Effect of calcium on Staphylococcus aureus biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2013. – Vol. 103. – № 2010. – P. 448–54.

12. 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.

13. von Eiff C., Peters G., Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci // *Lancet Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 2. – P. 677–685.

### References

1. Deryabin D.G. Stafilokokki: e'kologiya i patogennost' [Staphylococci: ecology and pathogenicity]. Yekaterinburg, UB RAS, 2000. 239 p.

2. Eroshenko D.V., Lemkina L.M., Korobov V.P. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya Biologiya – Bulletin of the Perm University. Biology*, 2012, no. 1, pp. 29–33.

3. Potekhina N.V. *Uspekhi biologicheskoy khimii – Biochemistry (Moscow). Special issue. Biological chemistry reviews*, 2006, no. 46, pp. 225–278.

4. Arrizubieta M.J., Toledo-Arana A., Amorena B., Penadés J.R., Lasa I. J. *Bacteriol.*, 2004, V. 186, no. 22, pp. 7490–7498.

5. Conrady D.G., Brescia, C.C., Horii, K., Weiss, A.A., Hasset, D.J., Herr, A.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, Vol. 105, no. 49, pp. 19456–19461.

6. Dunne Jr.W., Burd E. *Microbiol. Immunol.*, 1992, Vol. 36, no 10, pp. 1019–1027.

7. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2008, Vol. 29, no. 11, pp. 996–1011.

8. Gossas T., Danielson U.H. *Biochem. J.*, 2006, Vol. 398, pp. 393–398.

9. Götz F. *Molecular Microbiology*, 2002, Vol. 43, no. 6, pp. 1367–1378.

10. Ozerdem Akpolat N., Elçi S., Atmaca S., Akbayin H., Gül K. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2003, Vol. 48, № 5, pp. 649–653.

11. Shukla S.K., Rao T.S. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2013, Vol. 103, no. 2010, pp. 448–54.

12. Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2007, Vol. 115, no. 8, pp. 891–899.

13. von Eiff C., Peters G., Heilmann C. *Lancet Infect. Dis.*, 2002, Vol. 2, pp. 677–685.

### Рецензенты:

Плотникова Е.Г., д.б.н., профессор, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь;

Горовиц Э.С., д.м.н., профессор, Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 27.12.2014.