

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 579.842.11: 612.397.81
DOI 10.17816/pmj36298-101

ИЗМЕНЕНИЕ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ *ESCHERICHIA COLI* В ПРИСУТСТВИИ ХОЛЕСТЕРИНА

Л.П. Быкова*, Я.П. Трапезников, А.П. Годовалов

Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Россия

CHANGES IN GROWTH CHARACTERISTICS AND BIOFILM-FORMING ACTIVITY OF *ESCHERICHIA COLI* WITH CHOLESTEROL AVAILABLE

L.P. Bykova*, Ya.P. Trapeznikov, A.P. Godovalov

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Цель. Оценить ростовые свойства и образование биопленок *E. coli* в присутствии разных концентраций холестерина.

Материалы и методы. Штаммы *E. coli* культивировали в мясопептонном бульоне с добавлением холестерина в концентрациях 3; 5; 7 и 9 ммоль/л, а также в питательной среде, не содержащей холестерин. Определяли ростовые параметры и концентрацию холестерина в пробах до и после культивирования микроорганизмов, а также влияние холестерина на биопленкообразующую активность *E. coli*.

Результаты. Показано, что холестерин не оказывает бактерицидного действия на *E. coli*, однако способен менять продолжительность фаз роста штаммов, что, возможно, обусловлено адаптацией к присутствию холестерина и переключением метаболических путей. Холестерин оказывает стимулирующее влияние на накопление тест-штабмом биомассы и его биопленкообразующую активность.

Выводы. В проведенном исследовании показана способность *E. coli* метаболизировать человеческий холестерин.

Ключевые слова. *E. coli*, холестерин, метаболизм, биопленка, кинетика роста.

Aim. To assess the growth properties and formation of *E. coli* biofilms with different concentrations of cholesterol available.

Materials and methods. *E. coli* strains were cultivated in the meat-peptone broth with cholesterol added in the concentration of 3, 5, 7 and 9 mmol/l as well as in the nutrient medium without cholesterol. The growth parameters and cholesterol concentration in the samples prior to and after cultivating microorganisms and the effect of cholesterol on biofilm-forming activity of *E. coli* was determined.

© Быкова Л.П., Трапезников Я.П., Годовалов А.П., 2019

тел. +7 (342) 236 44 85

e-mail: AGodovalov@gmail.com

[Быкова Л.П. (*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии; Трапезников Я.П. – студент лечебного факультета; Годовалов А.П. – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ].

Results. Cholesterol was shown to have no bactericidal effect on *E. coli*, however, it is able to change the duration of growth phases of the strains that is, possibly, caused by adaptation to the presence of cholesterol and switching of metabolic pathways. Cholesterol has a stimulating effect on accumulation of biomass by the test-strain and its biofilm-forming activity.

Conclusions. In the study performed, the ability of *E. coli* to metabolize human cholesterol was shown.

Key words. *E. coli*, cholesterol, metabolism, biofilm, growth kinetics.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время активно изучается вопрос о взаимодействии микроорганизмов с эукариотическими клетками [1]. Контакты между организмами осуществляются на молекулярном уровне, когда молекулы макроорганизма в той или иной степени могут быть участниками метаболизма прокариотических клеток. Показано, что резидентная и транзитная микрофлора кишечника человека, синтезируя, трансформируя или разрушая экзогенные и эндогенные стерины, активно участвует в метаболизме макромолекул, в частности холестерина [2–3]. Описана утилизация холестерина микроорганизмами как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Первая идентификация продуктов деградации холестерина была представлена Ногват и Кримли в 1947 г., которые продемонстрировали продукцию холестенона и 7-дегидрохолестерина у видов *Azotobacter* [6].

Относительно мало сведений о включении холестерина в метаболизм микроорганизмов, имеющих медицинское значение. Идеальной системой для изучения биосинтеза фосфолипидов является *Escherichia coli*, поскольку ферменты микроорганизма участвуют в биосинтезе *de novo* фосфолипидов [6]. В связи с этим можно предположить, что ферменты *E. coli* могут быть вовлечены в метаболизм холестерина.

Цель исследования – оценить ростовые свойства и образование биопленок *E. coli* в присутствии разных концентраций холестерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использованы штаммы *E. coli* из коллекции ATCC, которые культивировали в мясопептонном бульоне с добавлением холестерина (США) в концентрациях 3; 5; 7 и 9 ммоль/л, а также в питательной среде, не содержащей холестерин. В течение 24 ч каждый час проводили измерение оптической плотности бульона при 580 нм с помощью планшетного спектрофотометра PowerWave X (США). Концентрацию холестерина определяли в пробах до и после культивирования микроорганизмов.

Для определения антибактериального действия холестерина использовали диско-диффузионный метод, когда диски из стерильной фильтрованной бумаги пропитывали в растворах с разной концентрацией холестерина. После непродолжительного подсушивания диски помещали на поверхность мясопептонного агара с посевом тест-штамма. Учитывали зоны задержки роста вокруг дисков в миллиметрах.

Биопленкообразующую активность *E. coli* в присутствии разных концентраций холестерина определяли согласно [5] в плоскодонных полистироловых планшетах. В лунки планшета вносили микробную суспензию тест-штамма и готовили разведения холестерина. Для каждой концентрации холестерина использовали не менее 3 повторностей. Через 24 ч инкубации планктонную часть удаляли, лунки промывали физиологическим

раствором и окрашивали генцианвиолетом с последующей спиртовой экстракцией окрашенного продукта [5].

Для определения уровня холестерина в питательной среде использовали ферментативный метод с помощью набора реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Детекцию результатов осуществляли с помощью планшетного спектрофотометра PowerWave X (США). Суть метода заключается в том, что под действием фермента фолестеролэстеразы эфиры холестерина распадаются на холестерин и жирные кислоты. Далее холестерин окисляется под воздействием холестеролоксидазы с выделением перекиси водорода. Образовавшаяся перекись водорода в ходе реакции Триндера формирует окрашенное соединение. Интенсивность окраски реакционной среды прямо пропорциональна исходному содержанию холестерина в анализируемом растворе и определялась фотометрическим методом на приборе PowerWave X (США) в кюветах с длиной оптического слоя 10 мм при зеленом светофильтре (максимум поглощения – 540 нм).

Результат выражали в условных единицах оптической плотности (у.е.).

Статистическую обработку данных проводили с использованием парного варианта *t*-критерия Стьюдента, а также коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью диско-диффузионного метода показан рост тест-штаммов в плотную к дискиам, пропитанным холестерином, во всех изученных концентрациях. Следовательно, холестерин не обладает антибактериальным действием на *E. coli*.

В присутствии холестерина удлиняется фаза экспоненциального роста штаммов, что задерживает начало стационарной фазы. При культивировании *E. coli* в мясопептонном бульоне без холестерина фаза стационарного роста начинается через 6 ч, а в присутствии разных концентраций холестерина – через 18 ч (рисунок). Подобная ситуация может быть обусловлена переключением ряда метаболических путей, когда

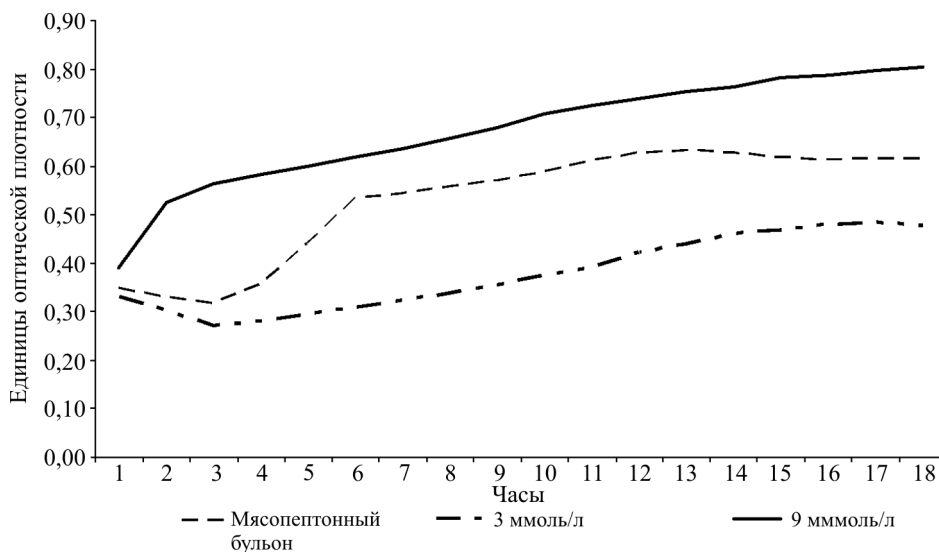


Рис. Кинетика роста *E. coli* в присутствии разных концентраций холестерина

происходит увеличение экспрессии генов, кодирующих синтез ферментов, метаболизирующих холестерин.

При изучении биопленкообразующей активности установлено ее увеличение при культивировании *E. coli* с холестерином в концентрации 3 ммоль/л – $0,55 \pm 0,03$ у.е. (в контрольных пробах – $0,30 \pm 0,03$ у.е.; $p < 0,05$). При увеличении концентрации холестерина способность *E. coli* к образованию биопленки существенно не меняется.

При проведении корреляционного анализа показано наличие прямой связи между концентрацией холестерина и уровнем биомассы ($r = 0,69$) и обратной связи между концентрацией холестерина и выраженностью биопленкообразующей активности *E. coli* ($r = -0,71$). Можно предположить, что при высокой концентрации холестерина микроорганизм переключает свой метаболизм, когда снижается синтез полисахаридов, необходимых для образования матрикса биопленки. В то же время в такой ситуации наблюдается избыточное накопление биомассы *E. coli*. Более того, показано, что утилизация липидов и холестерина микроорганизмами лежит в основе нарушения функционирования гистогематических барьеров [4].

Выводы

Таким образом, в проведенном исследовании показана способность *E. coli* метаболизировать человеческий холестерин, который, возможно, используется при формировании новых клеток микроорганизма.

Результаты исследования могут быть использованы для поиска и разработки способов коррекции содержания холестерина в крови с целью повышения эффективности лечения дислипидемических нарушений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Бадыхов И.И. Холестеринметаболизирующая активность клинических штаммов *Candida albicans*. Боткинские чтения: материалы Всерос. науч.-практ. конф. СПб. 2017; 52–53.
2. Трапезников Я.П., Быкова Л.П., Годовалов А.П. Холестеринметаболизирующая активность *Staphylococcus aureus*. Материалы I Российского микробиологического конгресса. Пущино 2017; 129.
3. Хамагаева И.С., Цыбикова А.Х., Замбалова Н.А. Исследование холестеринметаболизирующих свойств пробиотических микроорганизмов. Молочная промышленность 2011; 10: 56.
4. Lob L.N., McCarthy E.M.C., Narang P., Khan N.A., Ward T.H. *Escherichia coli* K1 utilizes host macropinocytic pathways for invasion of brain microvascular endothelial cells. Traffic 2017; 18(11): 733–746.
5. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp 2011; 47: 2437.
6. Wilkison W.O., Bell R.M. sn-Glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta 1997; 1348: 3–9.

Материал поступил в редакцию 29.01.2019