

А.С. Семенець, Н.Ю. Водзінська, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* 502 ЗА ПРИСУТНОСТІ ЕКЗОГЕННОГО НІЗИНА

Мета роботи: встановити вплив екзогенного нізину на формування біоплівки *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 502 та вміст полісахаридів в її матриксі.

Матеріали та методи. як тест-мікроорганізм використовували штам бактерії *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 502, що був отриманий з колекції мікроорганізмів Білоруського державного технологічного університету. Як джерело нізину використовували комерційний препарат Nisaplin® (Sigma-Aldrich Co.), що містив 2,5 % чистого нізину. Кінцеві концентрації нізину, що вивчались у даній роботі, становили 0,025–250 нг/мл. Культивування проводили при 30 °C впродовж 48 годин у середовищі ТДЕС в 48-лункових плоскодонних планшетах Nislon. Кількість планктонних клітин оцінювали спектрофотометрично, масу біоплівки – за методом забарвлення кристалічним фіолетовим, вміст полісахаридів у матриксі – за методом забарвлення конго червоним. **Результати.** В системі планктон–біоплівка нізін у концентраціях вищих за 62,5 нг/мл чинить виражену інгібувальну дію на утворення біоплівки та вміст полісахаридів в матриксі. За концентрацій аутоіндуктора 125 і 250 нг/мл маса біоплівки становила лише 11 % та 7 % від контролю, а рівень полісахаридів в матриксі знижувався у 3,6 та 8,3 рази, відповідно. Планктонні клітини виявилися менш чутливими до дії нізину: за двох найбільших з досліджених концентрацій їх вміст складав 60 % від контролю. Стимулюючий ефект аутоіндуктора спостерігався в узькому діапазоні концентрацій. Маса біоплівки зростала в 1,6 рази за присутності нізину в концентрації 2,5 нг/мл. Вміст полісахаридів у матриксі збільшувався на 20–24 % за концентрацій аутоіндуктора 2,5–12,5 нг/мл. **Висновки.** Отримані результати дозволяють припустити, що високі концентрації нізину інгібують сенсорну киназу NisK, що, у свою чергу, перешкоджає активації генів системи кворуму *L. lactis*.

Ключові слова: *Lactococcus lactis*, нізін, біоплівка, екзополісахариди

Нізін є поліциклічним антибактеріальним пептидом, який синтезується численними штамми бактерії *Lactococcus lactis* і широко застосовується як харчовий консервант [10, 14]. На відміну від інших бактеріоцинів, що виявляють антимікробну дію тільки щодо близькоспоріднених видів, цей лантибіотик ефективний проти багатьох грампозитивних бактерій: лістерій, стафілоко-



ков, бацил, клостридій [7–9]. Біоінженерні аналоги нізіна пригнічують ріст грамнегативних мікроорганізмів. Крім того, нізин є аутоіндуктором системи quorum sensing у *L. lactis* [2, 11, 12]. Позаклітинний пептид зв'язується з сенсорною кіназою NisK, внаслідок чого вона активується і фосфорилує білок-регулятор. Активованій білок-регулятор набуває полімеразної активності та викликає експресію генів системи кворуму [7, 12]. Під контролем системи quorum sensing знаходиться біосинтез власних сигнальних молекул, численних факторів патогенності та низки вторинних метаболітів бактерій [1, 12, 13]. Важливим наслідком активації системи кворуму є утворення біоплівки, у складі яких мікроорганізми придбають важливі для виживання якості: стійкість до несприятливих факторів довкілля та антимікробних препаратів. З практичної точки зору розробка підходів до контролю (як негативного так і позитивного) формування біоплівки є актуальним завданням. Так у біотехнології використання процесу формування біоплівки дозволяє значно підвищити вихід корисних продуктів мікробного синтезу [1, 14, 15], зокрема, розробляються біоплівкові реактори для отримання нізіна. У той же час, у медичній практиці утворення біоплівки умовно-патогенними мікроорганізмами призводить до значного ускладнення терапії інфекційних захворювань. У ряді робіт була продемонстрована здатність нізіна сповільнювати, або пригнічувати утворення біоплівки деякими грампозитивними бактеріями [6,9,13]. Однак відомостей щодо його впливу на цей процес у *L. lactis* немає. Тому метою роботи було встановлення впливу екзогенного нізіна на формування біоплівки *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502 та вміст полісахаридів в її матриці.

Матеріали та методи

У роботі як тест-мікроорганізм використовували штам бактерії *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502, що був отриманий з колекції мікроорганізмів Білоруського державного технологічного університету.

Як джерело нізіна використовували комерційний препарат Nisaplin® (Sigma-Aldrich Co.), що містив 2,5 % чистого нізіна. Стокові розчини препарату готували на основі стерильного розчину 0,02 N HCl, які зберігали при температурі 4 °C. Кінцеві концентрації нізіна, що вивчались у даній роботі, становили 0,025–250 нг/мл.

Культивування штаму проводили на середовищі ТДЕС, яке містило у 1 л: глюкозу – 10 г; триптон – 15 г; дріжджовий екстракт – 5 г; KH_2PO_4 – 2 г; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,035 г.

Добову культуру *L. lactis*, вирощену на скошеному щільному середовищі ТДЕС в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином і визначали вміст клітин спектрофотометрично. Отриману суспензію розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації 2×10^4 кл/мл. В стерильні 48-лункові плоскодонні планшети Nuclon вносили по 1 мл середовища ТДЕС у кожен лунку. Після цього у лунки додавали по 50 мкл суспензії мікроорганізму. Таким чином, кінцева концентрація клітин дорівнювала 1×10^3 кл/мл. Далі до усіх до-



слідних лунок додавали по 20 мкл відповідного стокового розчину нізина, а у контрольні лунки – по 20 мкл стерильного розчину 0,02 N HCl [11]. Інкубацію проводили при температурі 30 °C впродовж 48 годин. По закінченні терміну інкубації з кожної лунки ретельно відбирали планктонну культуру і переносили в інший планшет та вимірювали її оптичну густину на спектрофотометрі «μQuant» BioTek (Угорщина) при довжині хвилі 540 нм.

Біоплівку у планшетах тричі відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином та фіксували 96 % етанолом впродовж 10 хв. Після фіксації зразки висушували та забарвлювали 1% водним розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв. Біоплівку у планшетах після 24-годинного висушування при кімнатній температурі розчиняли у 0,1 M NaOH, що містив 1% додецилсульфату натрію. Облік результатів здійснювали на спектрофотометрі «μQuant» BioTek при довжині хвилі 592 нм, що відповідає максимуму поглинання використаного барвника: [13].

Метод визначення вмісту полісахаридів базується на здатності барвника конго червоного зв'язуватися з полісахаридами матриксу біоплівки. Біоплівку *L. lactis* відмивали та фіксували, як описано у попередній методиці. Після фіксації зразки висушували та забарвлювали 1% водним розчином конго червоного впродовж 5 хв. Після висушування у лунки додавали лізуючий розчин та залишали на 1,5 годин. Облік результатів проводили на спектрофотометрі «μQuant» BioTek при довжині хвилі 490 нм [29].

Всі експерименти проводили у 3 незалежних дослідах з 6 повторами у кожному.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників ($\bar{X}$) та їх стандартну помилку ($S_{\bar{X}}$). Вірогідність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.

Результати та їх обговорення

Дослідження властивостей штаму *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 502 показало, що він є продуцентом нізина. Дводобова культуральна рідина після видалення клітин лактококу та доведення рН до 6,5 виявляла антимікробну дію у відношенні *Micrococcus luteus*. Діаметр зони затримки росту становив $23,4 \pm 1,8$ мм (неопубліковані власні результати). Штам виявився здатним формувати біоплівку на поверхні лунок плоскодонних планшетів. На рис. 1 наведені фотографії біоплівки *L. lactis*, забарвленої кристалічним фіолетовим (а), який зв'язується як з клітинами, так і з матриксом біоплівки, а також конго червоним (б), який виявляє полісахариди матриксу.

Як свідчать фотографії, досліджуваний штам *L. lactis* утворює міцну біоплівку, яка, як і полісахариди матриксу, рівномірно покриває поверхню лунок. На рис. 1а видно мікроколонії, занурені у матрикс.



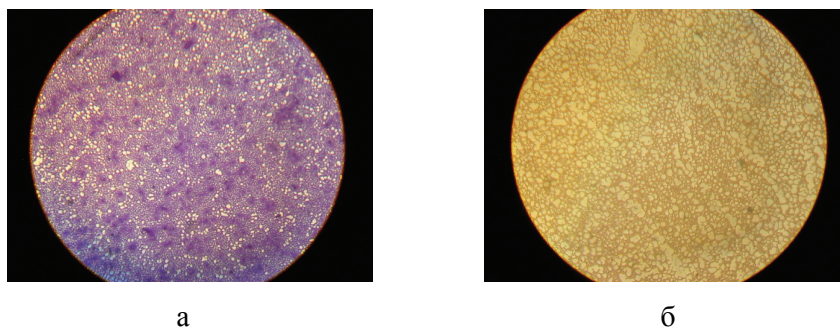


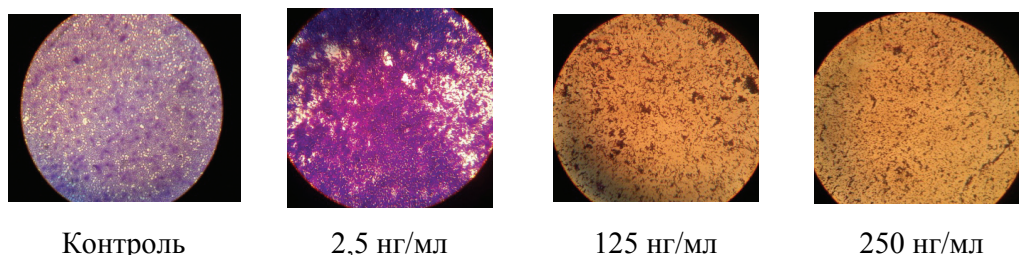
Рис. 1. Загальний вигляд біоплівки *L. lactis* під мікроскопом (×400)

а – забарвлення кристалічним фіолетовим; б – забарвлення конго червоним

Fig. 1. General view of *L. lactis* biofilms under the microscope (× 400)

a – crystal violet staining; b – congo red staining

Культивування *L. lactis subsp. lactis* 502 у присутності різних концентрацій екзогенного нізіна виявило різноспрямовану дію лантибіотику на формування біоплівки (рис. 2).



Контроль

2,5 нг/мл

125 нг/мл

250 нг/мл

Рис. 2. Загальний вигляд біоплівки *L. lactis*, сформованої за різних концентрацій нізіна (×400, забарвлення кристалічним фіолетовим)

Fig. 2. General view of *L. lactis* biofilms, formed by different concentrations of nisin (×400; crystal violet staining)

Так, за впливу 2,5 нг/мл нізіна формується більш міцна у порівнянні з контролем біоплівка, в якій спостерігається злиття окремих мікроколоній. У той же час, на два порядки вищі концентрації нізіна суттєво пригнічують утворення біоплівки. За вмісту у середовищі 125 нг/мл лантибіотику у складі біоплівки присутні лише окремі мікроколонії і майже не видно матриксу. Найвища з досліджених концентрацій (250 нг/мл) повністю запобігає формуванню мікроколоній і біоплівка представлена окремими адгезованими до поверхні клітинами та дуже тонким шаром матриксу.

Кількісна оцінка маси біоплівок, що утворювалися *L. lactis* за впливу різних концентрацій нізіна, наведена на рис. 3. Отримані результати виявили, що у присутності 2,5 нг/мл маса біоплівки в 1,6 рази перевищує контрольне значення. Починаючи з концентрації 62,5 нг/мл відбувається пропорційне вмісту нізіна зменшення маси біоплівки. За 125 та 250 нг/мл вона складає лише 11 % та 7 % від контрольного рівня.

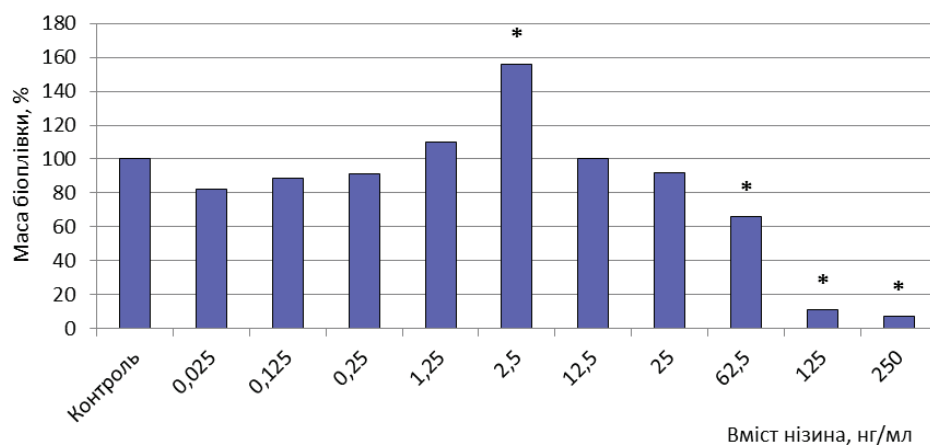


Рис. 3. Вплив різних концентрацій нізіна на масу біоплівки *L. lactis*,

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 3. The effect of different concentrations of nisin on *L. lactis* biofilms weight

Note: * – distinctions are reliable as compared to control

Такі ж самі закономірності виявлені при дослідженні вмісту полісахаридів у матриці біоплівок (рис. 4). Він збільшувався на 20–24 % за концентрацій аутоіндуктора 2,5–12,5 нг/мл, але різко знижувався (у 3,6 та 8,3 рази) за концентрацій нізіну 125 і 250 нг/мл, відповідно.

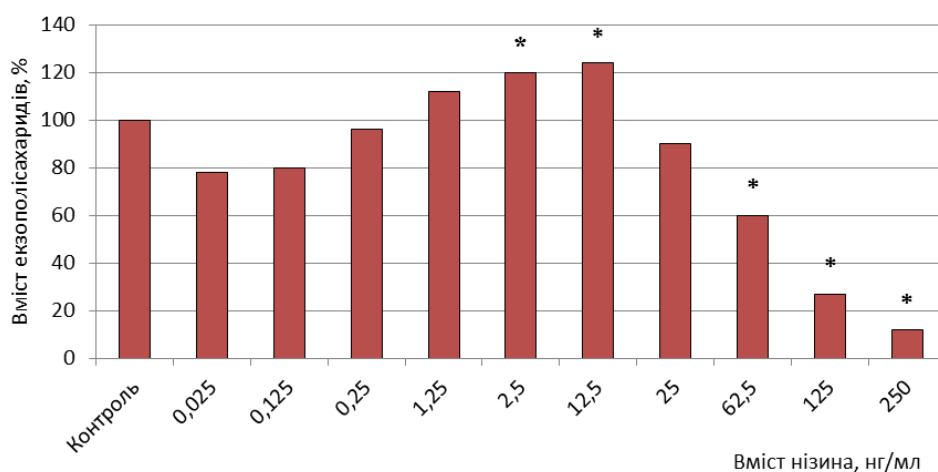


Рис. 4. Вплив різних концентрацій нізіна на вміст полісахаридів в матриці біоплівки *L. lactis*

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 4. The effect of different concentrations of nisin on polysaccharides content in *L. lactis* biofilms matrix

Note: * – distinctions are reliable as compared to control



Планктонні клітини виявилися менш чутливими до дії нізіна: за двох найбільших з досліджених концентрацій їх вміст складав 60 % від контролю. Інші концентрації аутоіндуктора значних змін не викликали (рис. 5).

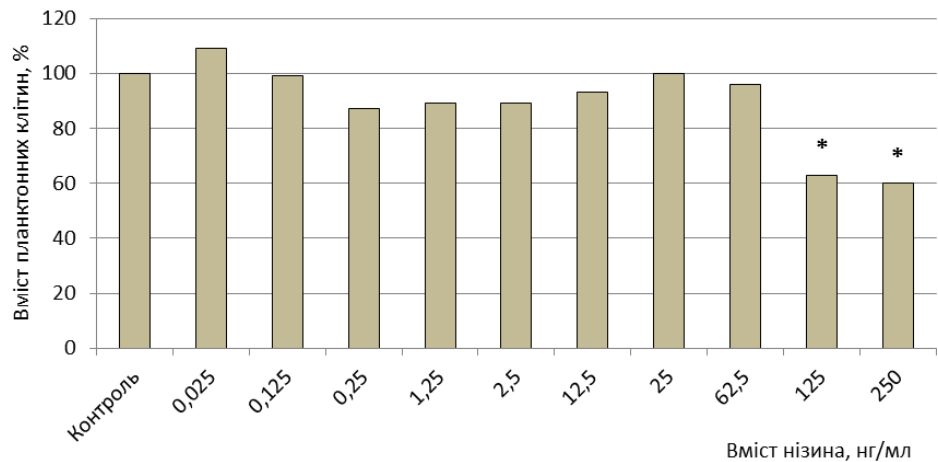


Рис. 5. Вплив різних концентрацій нізіна на вміст планктонних клітин *L. lactis*

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 5. The effect of different concentrations of nisin on the content of *L. lactis* planktonic cells

Note: * – distinctions are reliable as compared to control

Таким чином, проведене дослідження показало, що нізін може здійснювати різноспрямований вплив на *L. lactis*, який є продуцентом цього лантибіотику. Стимулюючий ефект на утворення біоплівки та синтез екзополісахаридів спостерігається у вузькому діапазоні концентрацій нізіна в середовищі – 2,5–12,5 нг/мл. Разом з тим, вперше встановлено, що нізін здатний пригнічувати утворення біоплівки не тільки умовно-патогенними бактеріями [7–9], але і власним продуцентом. У діапазоні концентрацій 62,5–250 нг/мл аутоіндуктор суттєво знижує масу біоплівки і вміст екзополісахаридів. Незначний вплив нізину на вміст планктонних клітин дає можливість припустити його переважну дію на систему кворуму, яка відповідає, зокрема, за формування біоплівки. Можна припустити, що за найбільших з використаних концентрацій нізіна відбувається інгібування сенсорної кінази NisK, що, в свою чергу, блокує активацію генів системи кворуму [11, 12]. Слід також зазначити, що для визначення механізмів виявленого характеру дії нізіна необхідним є проведення подальших досліджень, які дозволять розробити науково обґрунтовані підходи до його використання у біотехнології, харчової промисловості, медицині та ветеринарії.

А. С. Семенец, Н. Ю. Водзинська, Б. Н. Галкин, Т. О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина
e-mail: tphilippova@ukr.net

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ *LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS* 502 В ПРИСУТСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО НИЗИНА

Реферат

Цель работы: установить влияние экзогенного низина на формирование биопленки *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502 и содержание полисахаридов в ее матриксе. **Материалы и методы.** В качестве тест-микроорганизма использовали штамм бактерии *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502, который был получен из коллекции микроорганизмов Белорусского государственного технологического университета. Источником низина служил коммерческий препарат Nisaplin® (Sigma-Aldrich Co.), содержащий 2,5 % чистого низина. Конечные концентрации низина, изучавшиеся в данной работе, составляли 0,025–250 нг/мл. Культивирование проводили при 30 °C в течение 48 часов в среде ТДЕС в 48-луночных плоскодонных планшетах Nisclon. Количество планктонных клеток оценивали спектрофотометрически, массу биопленки – по методу окраски кристаллическим фиолетовым, содержание полисахаридов в матриксе – по методу окраски конго красным. **Результаты.** В системе планктон-биопленка низин в концентрациях, превышающих 62,5 нг/мл, оказывает выраженное ингибирующее действие на образование биопленки и содержание полисахаридов в матриксе. При концентрации аутоиндуктора 125 и 250 нг/мл масса биопленки составляла лишь 11 % и 7 % от контроля, а уровень полисахаридов в матриксе снижался в 3,6 и 8,3 раза, соответственно. Планктонные клетки оказались менее чувствительными к действию низина при двух наибольших из исследованных концентраций их содержание составляло 60 % от контроля. Стимулирующий эффект аутоиндуктора наблюдался в узком диапазоне концентраций. Масса биопленки возрастала в 1,6 раза в присутствии низина в концентрации 2,5 нг/мл. Содержание полисахаридов в матриксе увеличивалось на 20–24 % при концентрации аутоиндуктора 2,5–12,5 нг/мл. **Выводы.** Полученные результаты позволяют предположить, что высокие концентрации низина ингибируют сенсорную киназу NisK, что, в свою очередь, препятствует активации генов системы кворума *L. lactis*.

Ключевые слова: *Lactococcus lactis*, низин, биопленка, экзополисахариды.

A. S. Semenets, N. S. Vodsinska, B. M. Galkin, T. O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

BIOFILM FORMATION *LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS* 502 IN PRESENCE OF EXOGENOUS NISIN

Summary

Aim: Discovery of the exogenous nisin action on biofilm formation and matrix polysaccharides content in *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502. **Materials and**



methods. As test there were organism used bacteria of strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 502 received from the collection of microorganisms of Belarussian State Technological University. Commercial preparation Nisaplin (Sigma-Aldrich Co.), containing 2.5 % of pure nisin was used as a source of nisin. The final concentration of nisin was 0.025–250 ng/ml. The cultivation was carried 48 hours at 30 °C in TDES medium in 48-well flat-bottomed plates Nuclon. The number of the planktonic cells was assessed spectrophotometrically. The biofilms were stained with crystal violet. The matrix polysaccharides were stained with congo red. **Results.** Nisin in concentrations exceeding 62.5 ng/ml has a pronounced inhibitory effect on biofilm formation and polysaccharide content in the matrix. When autoinducer concentrations were 125 and 250 ng/ml biofilm mass were only 11 % and 7 % compared to control and the level of polysaccharide in the matrix decreased by 3.6 and 8.3 times, respectively, in the presence of 125 and 250 ng/ml of nisin. Planktonic cells were less sensitive to the action of nisin. In the presence of two highest concentrations of the autoinducers their content was 60 % from control. The stimulatory effect of nisin was observed over a narrow range of concentrations. Biofilm weight increased 1.6-fold in the presence of nisin at the concentration of 2.5 ng/ml. The content of polysaccharides in the matrix increased by 20–24 % at the concentration of autoinducer 2.5–12.5 ng/ml. **Conclusion.** The obtained results suggest that high concentrations of nisin inhibit sensory kinase NisK, that, in turn, prevents gene activation of genes of quorum system *L. lactis*.

Key words: *Lactococcus lactis*, nisin, biofilm exopolysaccharides.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий / Романова Ю. М., Смирнова Т. А., Андреев А. Л. и др. // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 556–561.
2. Шнаков А. О. Пептидные аутоиндукторы бактерий // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 3. – С. 291–303.
3. Brown S., Johnstone R. Cooperation in the dark: signalling and collective action in quorum-sensing bacteria // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2001. – Vol. 268. – P. 961–965.
4. Caplice E., Fitzgerald G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation // Int. J. Food Microbiol. – 1999. – Vol. 50. – P. 131–149.
5. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. – 1999. – V. 284. – P. 1318–1322.
6. Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F. et al. Discovering lactic acid bacteria by genomics // Antonie Leeuwenhoek. – 2002. – Vol. 82. – P. 29–58.
7. Guder A., Wiedemann I., Sahl H. Posttranslationally modified bacteriocins – the lantibiotics // Biopolymers. – 2000. – Vol. 55. – P. 62–73.
8. Bryan E. M., Bae T., Kleerebezem M. et al. Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria // Plasmid. – 2000. – Vol. 44. – P. 183–190.



9. Kim W. S., Hall R. J., Dunn N. W. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1998. – Vol. 50, 4. – P. 429–433
10. Mozzi F., Raya R. R., Vignolo G. M. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. – John Wiley and Sons, 2010. – 393 p.
11. Parsek M., Greenberg E. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms // Trends Microbiol. – 2005. – Vol. 13. – P. 27–33.
12. Quadri L. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria // Antonie van Leeuwenhoek – 2002. Vol. 82. – P. 133–145.
13. Swift S., Vaughan E., de Vos W. M. Quorum sensing within the gut ecosystem // Microbial Ecol. Health Dis. – 2000. – Vol. 12. – P. 81–92.
14. Mahdavi M., Jalali M., Kermanshahi R. et al. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method / // Research in Pharmaceutical Sciences. – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 113–118.
15. Welman A. D., Maddox I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges // Trends in Biotechnology – 2003. – V. 21. – P. 269–274.

Стаття надійшла 08.08.2015 р.

