

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.042.2

ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЛЁНКИ ПОСРЕДСТВОМ
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ ВОССТАНОВЛЕННОГО ВОДНОГО РАСТВОРА

А. Г. Погорелов*, А. Л. Кузнецов, А. И. Панаит, М. А. Погорелова, О. А. Суворов,
член-корреспондент РАН Г. Р. Иваницкий

Поступило 28.12.2018 г.

В данной работе изучали тонкое строение бактериальной плёнки, сформированной на внутренней поверхности проточного реактора. Используя подходы сканирующей электронной микроскопии (SEM), исследовали детали рельефа биоплёнки. Анализировали действие электрохимически восстановленного водного (ERW) раствора на ультраструктуру биоплёнки, созданную планктонной формой *E.coli* и/или лактобактериями. Показано, что обработка посредством ERW-раствора разрушает полимерный матрикс биоплёнки и её клеточную компоненту.

Ключевые слова: биоплёнка, сканирующая электронная микроскопия, циркуляционный реактор, *E.coli*, молочнокислые бактерии, катодит.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863395-397>

Во многих отраслях производства образование биоплёнки приводит к значительным потерям ресурсов и снижению эффективности, что заставляет искать способы её удаления [1, 2]. Микробная плёнка образуется на границе твёрдой поверхности и влажной среды в виде многоклеточного сообщества, погружённого в полимерный матрикс [3, 4]. По сравнению с планктонной формой биоплёнка, формируя собственный гомеостаз, обеспечивает микроорганизмам защиту от антибиотиков, а также от механического разрушения внешним потоком жидкости [5–7]. Повышение устойчивости к антимикробным препаратам требует значительного увеличения их концентрации в дезинфицирующих растворах, что оказывает дополнительную экологическую нагрузку на окружающую среду. Поэтому актуальной является разработка принципиально новых способов удаления биоплёнки, которые были бы одновременно экономичны, эффективны и экологически безопасны. Альтернативу традиционной очистке представляет обработка электрохимически активированными (ЭХА) водными растворами, обладающими широким бактерицидным диапазоном действия [8, 9].

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской Академии наук, Пушкино Московской обл.*

*E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы исследовать эффект, который оказывает на клеточную компоненту и матрикс обработка бактериальной плёнки ЭХА-раствором.

Работа выполнена на бактериальной плёнке, сформированной в циркуляционном реакторе в условиях лабораторного эксперимента [10–12]. Слой микроорганизмов формировался на внутренней поверхности пористой трубки из ПВХ в водном потоке, содержащем суспензию клеток кишечной палочки *E. coli* или/и молочнокислых бактерий. Бактериальную плёнку удаляли посредством обработки просвета трубки потоком ЭХА водного раствора — катодита (окислительно-восстановительный потенциал –50 мВ, pH 13,5). В качестве контроля использовали бактериальную плёнку, которую промывали обычной водой (окислительно-восстановительный потенциал +290 мВ, pH 7,3). Изменение тонкой структуры поверхности образца изучали посредством сканирующей электронной микроскопии (SEM). Основные принципы подготовки препарата для SEM описаны ранее [13, 14]. Кратко, отрезок трубки циркуляционного реактора фиксировали в растворе 1,5% глутарового альдегида при 4 °С в течение 12 ч, затем в растворе 1% OsO₄ при комнатной температуре. После фиксации образец дегидратировали в батарее растворов этанола возрастающей концентрации: 50, 75, 80, 90 и 98%. Для удаления спирта образцы переносили в гексаметилдисилазан (HMDS), после чего высуши-

вали на воздухе. Готовый препарат прикрепляли к держателю микроскопа с последующим нанесением на его поверхность плёнки платины (10 нм) в установке JFC-1600 (“JEOL”, Япония). Тонкую структуру рельефа поверхности изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (“JEOL”, Япония), используя режим вторичных электронов при ускоряющем напряжении 10 кВ.

На рис. 1 представлены микрофотографии бактериальной плёнки, полученные посредством SEM. Препарат сформирован на внутренней поверхности пористой трубки из поливинилхлорида (ПВХ) в циркуляционном реакторе при разных условиях удаления слоя бактерий.

Из рисунка видно, что используемый лабораторный реактор эффективен для формирования бактериальной плёнки. Предложенная схема эксперимента позволяет как задавать параметры культивирования бактериальной плёнки, так и моделировать условия воздействия. Сравнение ультраструктуры рельефа препарата после отмывки обычной водой или щелочным ЭХА водным раствором (католитом) показывает качественное различие рассматриваемых способов обработки. На микрофотографии (рис. 1а)

контрольного препарата нельзя различить отдельные виды молочнокислых бактерий, но плотная многослойная упаковка клеток свидетельствует о формировании зрелого матрикса.

Иную картину мы наблюдали после промывки просвета трубки католитом (рис. 1б), когда происходило полное удаление клеточного состава. На обрабатываемой поверхности оставались отдельные фрагменты матрикса, которые не визуализировались посредством оптической микроскопии. Таким образом, католит оказывал значительное дезинфицирующее действие, хотя фрагменты матрикса могут быть причиной быстрой регенерации бактериальной плёнки.

Представляет интерес формирование и дезинтеграция биоплёнки, сформированной композицией молочнокислых бактерий и *E. coli*. Кишечная палочка сосуществует в симбиозе с человеком и легко распространяется во многих сферах его деятельности. Поэтому в пищевом и сельскохозяйственном производстве этот микроорганизм служит санитарным показателем состояния предприятия. Сравнительные микрофотографии, иллюстрирующие данный эксперимент, представлены на рис. 2.

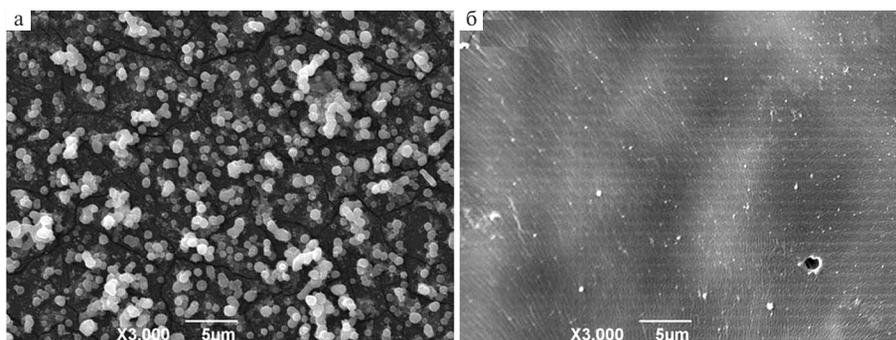


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия биоплёнки, сформированной только молочнокислыми бактериями на внутренней поверхности ПВХ трубки циркуляционного реактора: (а) — плёнка отмыта потоком обычной воды; (б) — плёнка отмыта потоком католита, фракция ЭХА водного раствора.

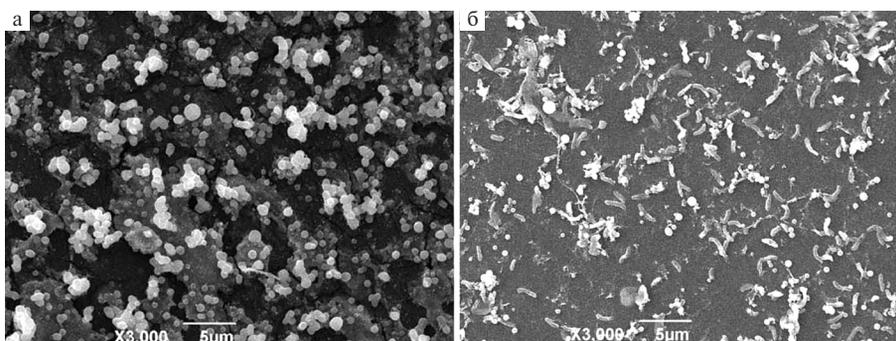


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия биоплёнки, сформированной композицией кишечной палочки и молочнокислых бактерий на внутренней поверхности ПВХ-трубки циркуляционного реактора: (а) — плёнка отмыта потоком обычной воды; (б) — плёнка отмыта потоком католита, фракция ЭХА водного раствора.

На рисунке 2а видно, что для контрольного препарата характерна структура в виде колоний, содержащих клетки кишечной палочки. В результате обработки католином вид плёнки существенно менялся (рис. 2б). Как и в случае без *E. coli* молочнокислые бактерии удалены, но на поверхности остались фрагменты клеток. Результат анализа ПЦР с обратной транскрипцией (данные не представлены) показал, что эти фрагменты принадлежат кишечной палочке. Возможно, этот факт объясняется тем, что сцепление *E. coli* с относительно мягкой поверхностью трубки из ПВХ обусловлено не только адгезией, но и механическим закреплением посредством нитевидного придатка.

В завершение можно сделать следующие выводы. Морфологический анализ наличия на поверхности фрагментов матрикса и клеточной компоненты представляет собой эффективный подход для оценки качества удаления биоплёнки. Обработка ЭХА водным раствором разрушает основные компоненты бактериальной плёнки и производит выраженный дезинфицирующий эффект. Мы предполагаем, что католит, подавляя механизм адгезии бактерии к подложке, не влияет на механическое сцепление *E. coli* с микро рельефом поверхности посредством нитевидного придатка. Возможно, для более эффективного удаления матрикса следует использовать комбинированное воздействие обеих фракций ЭХА раствора.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 17–76–20014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garrett T.R., Bhakoo M., Zhang Z. // Prog. Nat. Sci. 2008. V. 18. P. 1049–1056.
2. Bakhir V.M., Pogorelov A.G. // Int. J. Pharm. Res. & Allied Sci. 2018. V. 7. P. 41–57.
3. Shirliff M.E., Mader J.T., Camper A.K. // Chem. Biol. 2000. V. 9. P. 859–871.
4. Costerton J.W. // Int. J. Antimicrob. Agents. 1999. V. 11. P. 217–221.
5. Bridier A., Briandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F. // Biofouling. 2011. V. 27. P. 1017–1032.
6. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan B.E., Singh P.K. // Science. 2011. V. 334. P. 982–986.
7. Drescher K., Shen Y., Bassler B.L., Stone H.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. 2013. V. 110. P. 4345–4350.
8. D'Atanasio N., Capezzone de Joannon A., Mangano G., Meloni M., Giarratana N., Milanese C., Tongiani S. // Wounds. 2015. V. 27. P. 265–273.
9. Cloete T.E., Thantsha M.S., Maluleke M.R., Kirkpatrick R. // J. Appl. Microbiol. 2009. V. 107. P. 379–384.
10. Ludecke C., Jandt K.D., Siegismund D., Kujau M.J., Zang E., Rettenmayr M., Bossert J., Roth M. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e84837–e84837.
11. Crusz S.A., Popat R., Rybtke M.T., Cámara M., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Diggle S.P., Williams P. // Biofouling. 2012. V. 28. P. 835–842.
12. Rollet C., Gal L., Guzzo J. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 290. P. 135–142.
13. Погорелов А.Г., Гаврилюк В.Б., Погорелова В.Н., Гаврилюк Б.К. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 3. С. 176–180.
14. Погорелов А.Г., Чеботарь И.В., Погорелова В.Н. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014. № 2. С. 133–136.

BACTERIAL FILM DISINTEGRATION WITH ELECTROCHEMICALLY REDUCED WATER

A. G. Pogorelov, A. L. Kuznetsov, A. I. Panait, M. A. Pogorelova,
O. A. Suvorov, Corresponding Member of the RAS G. R. Ivanitskii

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region, Russian Federation*

Received December 28, 2018

This work aimed to study the fine structure of bacterial films grown on the inner tuber surface of flow reactor. Applying scanning electron microscopy (SEM) approaches, the detailed biofilm relief was visualized. The action of electrochemically reduced water (ERW) on the biofilm ultrastructure generated by the plankton form of *E. coli* and/or lacto bacteria was investigated. Treatments with an ERW solution were exhibited to destroy the biofilm organic polymer matrix and bacterial cells embedded in a matrix.

Keywords: biofilm, scanning electron microscopy, flow cell reactor, *E. coli*, lactate bacteria, catholite.