

РАЗРУШЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННЫМ ВОДНЫМ РАСТВОРОМ

© 2019 г. А.Г. Погорелов, А.Л. Кузнецов, В.Н. Погорелова, О.А. Суворов, А.И. Панаит, М.А. Погорелова

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.03.2019 г.

После доработки 18.04.2019 г.

Принята к публикации 22.04.2019 г.

Исследовали действие электрохимически активированного водного раствора на тонкую структуру биопленки, образованной планктонной формой композиции молочнокислых бактерий и кишечной палочки. Бактериальная пленка была сформирована на внутренней поверхности трубки циркуляционного реактора, моделирующего трубопроводную коммуникацию. Ультразвуковую структуру рельефа биопленки визуализировали посредством сканирующей электронной микроскопии. Показано, что обработка последовательно катодом и анодом разрушает полимерный матрикс бактериальной пленки и ее клеточную компоненту.

Ключевые слова: биопленка, сканирующая электронная микроскопия, циркуляционный реактор, *E. coli*, молочнокислые бактерии, катод, анод.

DOI: 10.1134/S0006302919040124

Во многих отраслях формирование биопленки на технологических поверхностях приводит к значительным потерям ресурсов и снижает эффективность производства, что заставляет искать способы ее удаления [1]. Микробная пленка образуется во влажной среде на твердой поверхности в форме симбиоза клеток разного вида, погруженных в полимерный матрикс [2–4]. Благоприятной основой для биопленки является шероховатая подложка, которая способствует механическому закреплению микроорганизмов.

По сравнению с планктонной формой биопленка, формируя собственный гомеостаз, обеспечивает клеточной компоненте защиту от антибиотиков, а также от механического разрушения внешним потоком жидкости [5–7]. Удаление биопленки требует значительного увеличения концентрации антимикробных препаратов, что оказывает дополнительную экологическую нагрузку на окружающую среду и удорожает конечный продукт. Поэтому актуальной является разработка принципиально новых способов дезинтеграции биопленки, которые были бы одновременно экономичными, эффективными и эко-

логически безопасными. Альтернативу традиционной очистке представляет обработка поверхности электрохимически активированным водным раствором (ЭХАР), обладающим широким бактерицидным диапазоном действия [8–10]. Такой биофизический подход основан на том, что ЭХАР с измененными значениями pH и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП), находясь в метастабильном состоянии, со временем восстанавливает свойства исходной воды. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы в модельном эксперименте в контролируемых лабораторных условиях исследовать эффект, который оказывает обработка ЭХАР на клеточную компоненту бактериальной пленки и ее матрикс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в условиях лабораторного эксперимента на бактериальной пленке, сформированной на внутренней поверхности пористой поливинилхлоридной (ПВХ) трубки циркуляционного реактора [11–13]. Источником биопленки служил водный поток, содержащий планктонную форму бактерий. Начальную суспензию микроорганизмов получали из композиции высушенных штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав препарата «Эвиталия». Данный пре-

Сокращения: ЭХАР — электрохимически активированный водный раствор, ОВП — окислительно-восстановительный потенциал, ПВХ — поливинилхлорид, PCR-RT — полимеразная цепная реакция в реальном времени.

парат рекомендован для реализации в качестве биологически активной добавки к пище — источника пробиотических микроорганизмов. В качестве начальной планктонной формы кишечной палочки использовали суспензию *E. coli*, полученную из коллекции лаборатории Л.А. Железной (ИТЭБ РАН, Пущино). Удаление бактериальной пленки осуществляли, обрабатывая внутреннюю поверхность трубки реактора потоком ЭХАР различного химического состава и физико-химических свойств: католита (рН 13,5, ОВП ~ -50 мВ, удельная электропроводность 267 мСм/см) и анолита (рН 5,44, ОВП ~ 830 мВ, удельная электропроводность 1,9 мСм/см). Католит (насыщенный водородом щелочной раствор с отрицательным значением ОВП) получали электрохимической обработкой водного раствора гидроксида натрия. Анолит, содержащий комплекс метастабильных соединений активного хлора и активного кислорода (хлорноватистую кислоту, гипохлорит-ион, пероксид водорода и др.) в суммарной концентрации 500 ± 50 мг/л, получали электрохимической обработкой водного раствора хлорида натрия. Анолит характеризуется высоким положительным значением ОВП. Для контроля использовали образец бактериальной пленки, которую отмывали водой из бытового водопровода (рН 7,4, ОВП ~ 260 мВ, удельная электропроводность 0,4 мСм/см). Для измерения рН, ОВП и удельной электропроводности использовали многопараметрический прибор Excellence S470 (Mettler Toledo, Швейцария); суммарную концентрацию соединений активного хлора и активного кислорода в анолите определяли йодометрическим титрованием.

Изменение тонкой структуры образца изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Основные принципы подготовки препарата для электронно-микроскопического исследования описаны ранее [14,15]. Они включают в себя следующее: отрезок трубки циркуляционного реактора фиксировали в растворе 1,5% глутарового альдегида при 4°C в течение 12 ч, затем в растворе 1% OsO₄ при комнатной температуре. После фиксации образец дегидратировали в батарее этилового спирта возрастающей концентрации (50%, 75%, 80%, 90% и 98%). Для удаления спирта образцы переносили в гексаметилдисилазан, после чего сушили на воздухе. Готовый препарат крепили к держателю микроскопа с последующим нанесением на его поверхность пленки платины (10 нм) в установке JFC-1600 (Jeol, Япония). Тонкую структуру рельефа поверхности изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ, используя режим вторичных электронов.

Дезинфицирующую эффективность ЭХАР также проверяли с помощью анализа методом ПЦР в реальном времени (PCR-RT) по наличию ДНК *E. coli*, которая содержится в исходной бактериальной пленке. Ген *uidA* кишечной палочки является уникальным для данного микроорганизма, т.е. не встречается у эволюционно родственных видов или родов бактерий и не имеет близких гомологов в геномах бактерий других родов. Применяя Genomic DNA purification kit (Thermoscientific, #K0512), с внутренней поверхности трубки экстрагировали ДНК. В полученном растворе предварительно с помощью Quant-iT dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, США) определяли концентрацию ДНК посредством флуориметра Qubit. Наличие геномной ДНК *E. coli* анализировали методом PCR-RT, используя специфичные праймеры, на приборе 7300 RealTime PCR System (США) с длительностью программы 40 циклов. При подготовке пробы применили двухфазную температурную программу: вначале денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем денатурация при 94°C в течение 15 с, после чего отжиг и элонгация при 60°C в течение 60 с. В качестве тест-объекта использовали препарат (Sigma, США) с известным содержанием (0,001 нг) ДНК кишечной палочки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сличительная экспертиза способов обеззараживания требует использования унифицированных подходов формирования биопленки. Эта задача решается посредством специализированных стендов, позволяющих в лабораторных условиях воспроизводить условия роста биопленки, а также контролировать параметры протокола ее удаления. В настоящее время производство таких установок не освоено биологическим приборостроением, поэтому для формирования и дезинтеграции биопленки нами разработан действующий циркуляционный реактор (рис. 1).

Для формирования пленки микроорганизмы используют два основных механизма — адгезию и механическое закрепление на поверхности посредством специальных клеточных устройств (жгутик, псевдоподия, вырост цитоплазматической мембраны, ворсинка). Для моделирования указанных механизмов создали композицию, состоящую из двух видов бактерий. Молочнокислые бактерии относят к группе представителей микрофлоры, формирующих пленку посредством адгезии. Второй способ закрепления за счет механического сцепления с микрорельефом с помощью жгутика использует кишечная палочка.

В нашем исследовании подложкой для роста биопленки была трубка из ПВХ-полимера, на пористой поверхности которой бактериальная пленка растет относительно быстро, но по причи-

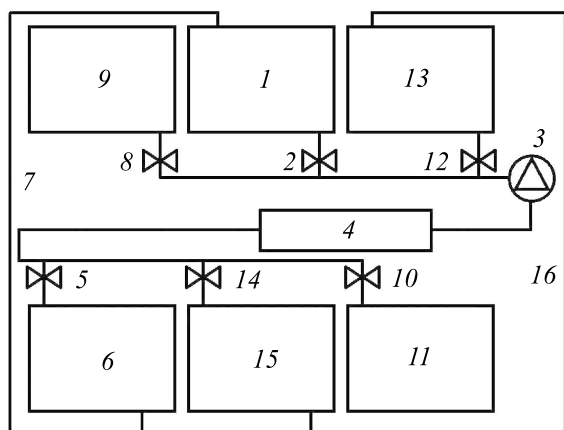


Рис. 1. Блок-схема лабораторного стенда для моделирования процесса формирования и дезинтеграции бактериальной пленки, разработанного в виде циркуляционного реактора: 1 – резервуар, 2 – кран, 3 – циркуляционный насос, 4 – трубопровод с расширением, 5 – кран, 6 – резервуар, 7 – трубопровод, 8 – кран, 9 – резервуар, 10 – кран, 11 – резервуар, 12 – кран, 13 – резервуар, 14 – кран, 15 – резервуар, 16 – трубопровод.

не пористости ее труднее удалить. Характерным критерием дезинтеграции биопленки является разрушение клеточной компоненты и матрикса. Поэтому, используя сканирующую электронную микроскопию, мы сравнивали строение биопленки, а также чистоту поверхности после ее обработки ЭХАР. На рис. 2 представлены микрофотографии препарата бактериальной пленки, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии. Образец сформирован в циркуляционном реакторе на внутренней поверхности пористой трубки из ПВХ. Удаление слоя бактерий проводили с помощью обработки фракцией восстановленного ЭХАР (католит).

Сравнение микрофотографий показывает качественное различие структуры препарата в зависимости от клеточного состава бактериальной пленки. Рассмотрим действие католита на пленку, состоящую только из молочнокислых бактерий. На микрофотографии контрольного образца (рис. 2а) нельзя различить виды молочнокислых бактерий, но плотная многослойная упаковка

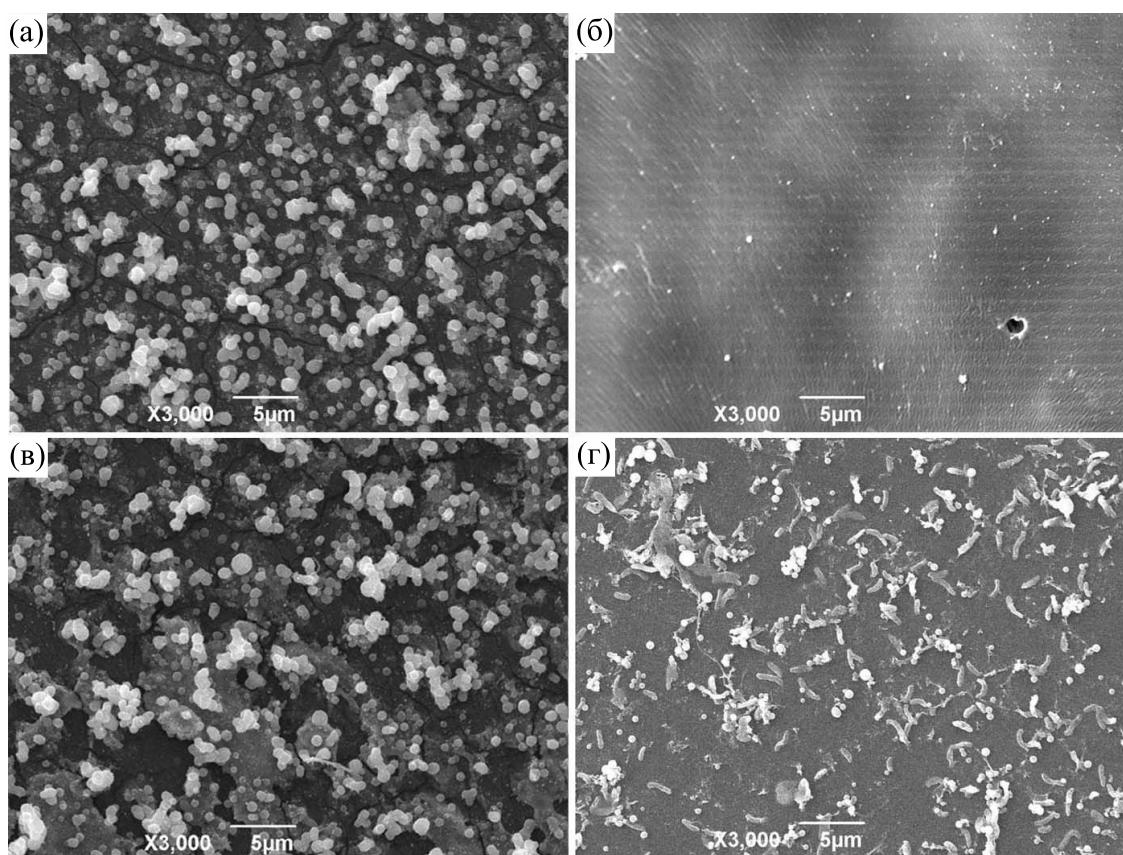


Рис. 2. Микрофотографии бактериальной пленки на внутренней поверхности ПВХ-трубки циркуляционного реактора. Изображения получены посредством сканирующей электронной микроскопии в режиме вторичных электронов: (а) – пленка сформирована молочнокислыми бактериями, отмыта потоком воды из бытового трубопровода; (б) – пленка сформирована молочнокислыми бактериями, отмыта потоком католита (фракция восстановленного ЭХАР); (в) – пленка сформирована композицией молочнокислых бактерий и кишечной палочки, отмыта потоком воды из бытового трубопровода; (г) – пленка сформирована композицией молочнокислых бактерий и кишечной палочки, отмыта потоком католита (фракция восстановленного ЭХАР).

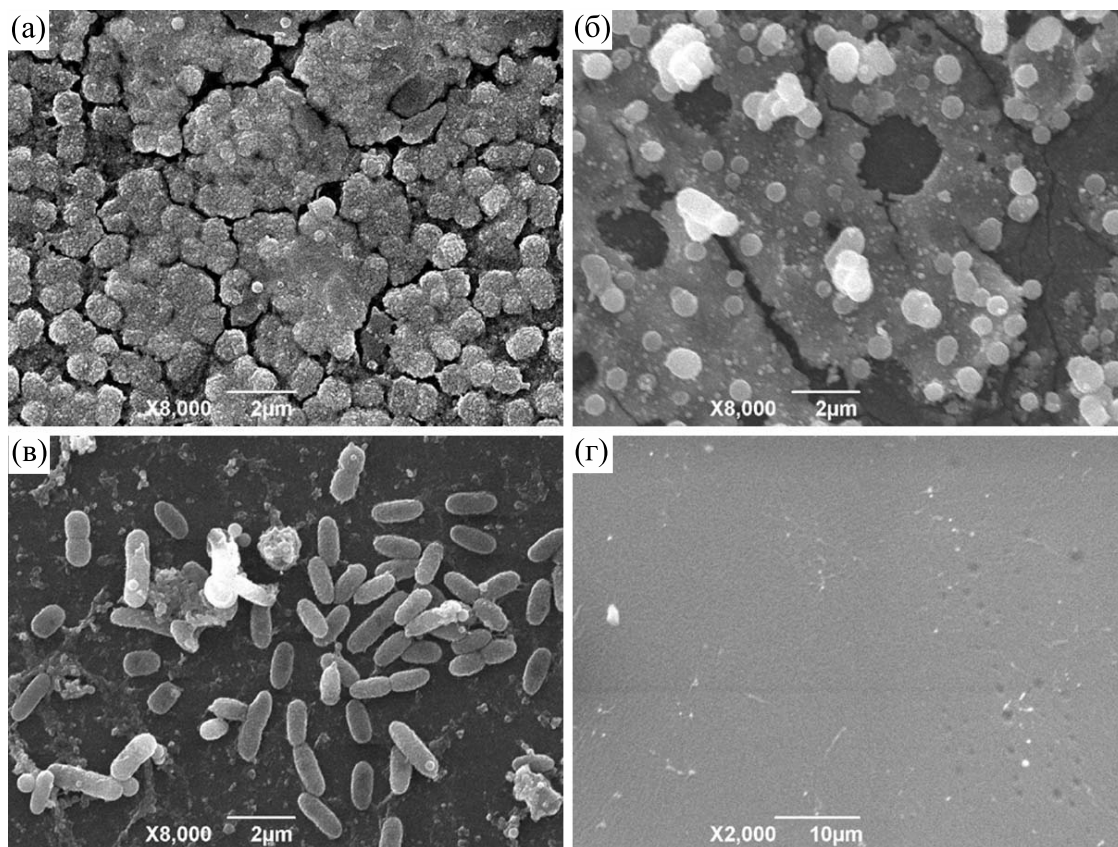


Рис. 3. Микрофотографии бактериальной пленки на внутренней поверхности ПВХ-трубки циркуляционного реактора. Изображения получены с помощью сканирующей электронной микроскопии в режиме вторичных электронов: (а) — пленка сформирована композицией молочнокислых бактерий и кишечной палочки, отмыта протоком воды из бытового трубопровода; (б) — пленка сформирована композицией молочнокислых бактерий и кишечной палочки, отмыта потоком 10% водного раствора NaOH; (в) — пленка сформирована композицией молочнокислых бактерий и кишечной палочки, отмыта потоком католита (восстановленная фракция ЭХАР); (г) — пленка сформирована композицией молочнокислых бактерий и кишечной палочки, отмыта потоком последовательно католита и анолита (окисленная фракция ЭХАР).

клеток свидетельствует о формировании зрелого матрикса. Отметим полное удаление клеточного состава после промывки просвета трубки католитом (рис. 2б). Похожая картина наблюдается в присутствии *E. coli*, когда обычная вода по-прежнему не оказывает действия на биопленку (рис. 2в), а католит удаляет лактобактерии (рис. 2г). Однако католит оставляет нетронутой популяцию кишечной палочки (рис. 2г).

Таким образом, можно прийти к следующему заключению. Обработка католитом оказывает дезинфицирующий эффект на пленку, образованную молочнокислыми бактериями, хотя на поверхности остаются микронные частицы матрикса. Эти фрагменты не визуализируются посредством оптической микроскопии, но наличие на подложке остаточной органической массы служит фактором, провоцирующим заселение *de novo* поверхности микроорганизмами. Католит не оказывает действия на кишечную палочку. В этом случае, возможно, для полной дезинтегра-

ции бактериальной пленки следует комбинировать действие обеих фракций ЭХАР. Результаты такого эксперимента иллюстрируют микрофотографии на рис. 3.

Видно (рис. 3а), что для контрольного препарата характерна структура в виде колоний с выраженным присутствием на поверхности препарата молочнокислых бактерий. В результате обработки 10%-м раствором NaOH, что принято в пищевой промышленности, вид пленки значительно меняется (рис. 3б), при этом видна многослойная структура. После применения католита ожидаемо наблюдается полное удаление пула молочнокислых бактерий (рис. 3в), но остаются клетки *E. coli*, закрепленные нитевидными придатками за микрорельеф поверхности. Наиболее эффективным оказалось последовательное действие католита и анолита (рис. 3г). В этом случае матрикс и клеточная фракция удаляются полностью, так что визуально идентифицируется очищенная поверх-

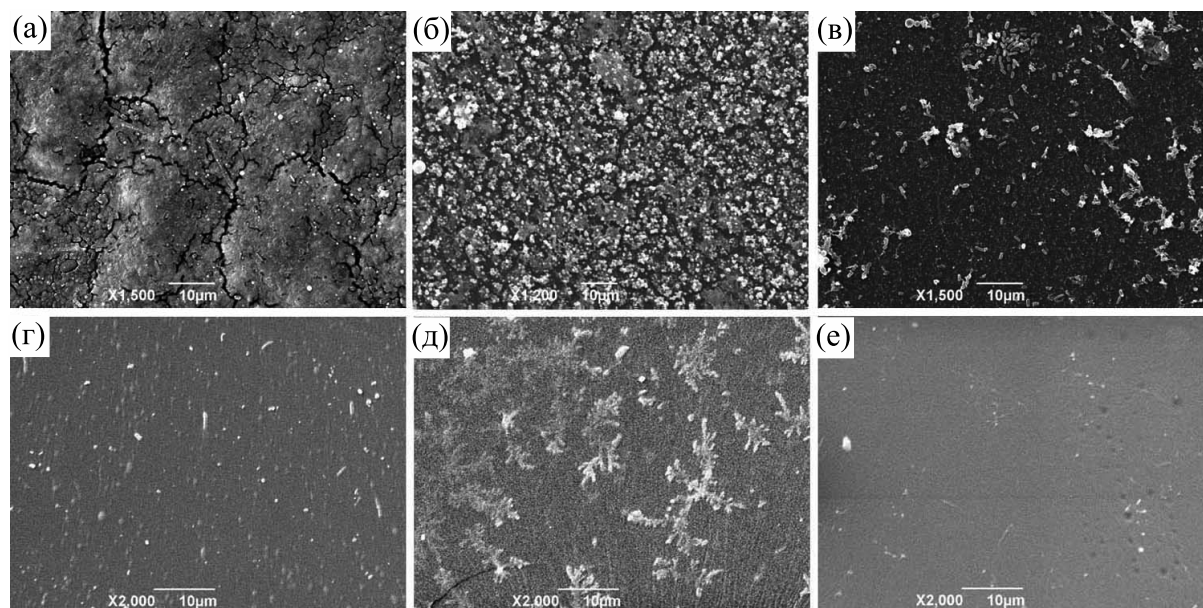


Рис. 4. Микрофотографии внутренней поверхности ПВХ-трубки циркуляционного реактора после обработки бактериальной пленки, содержащей молочнокислые бактерии и кишечную палочку. Изображения получены методом сканирующей электронной микроскопии в режиме вторичных электронов: (а) — биопленка отмыта потоком воды из бытового трубопровода; (б) — биопленка отмыта 10%-м водным раствором NaOH; (в) — биопленка отмыта католитом; (г) — поверхность после лизирования биопленки, предварительно отмытой потоком воды из бытового трубопровода; (д) — поверхность после лизирования биопленки, предварительно отмытой 10%-м водным раствором NaOH; (е) поверхность после лизирования биопленки, предварительно отмытой католитом.

ность ПВХ трубки с характерной пористой структурой.

Ультраструктурный анализ показывает сложную многослойную архитектуру бактериальной пленки, сформированной двумя видами микроорганизмов (рис. 3), где нижний уровень заселяют клетки *E. coli*. Из двух видов бактерий, моделирующих разные механизмы закрепления на поверхности подложки, кишечная палочка более устойчива к действию католита, чем молочнокислые бактерии. Удаление кишечной палочки требует комплексной обработки обеими фракциями ЭХАР. Отметим, что этот микроорганизм сосуществует в симбиозе с человеком и легко распространяется во многих сферах его деятельности, поэтому в пищевом и сельскохозяйственном производстве *E. coli* является санитарно-показательным микроорганизмом. На молекулярном уровне наличие гена кишечной палочки является критерием качества удаления сформированной биопленки. Следовательно, кишечную палочку следует рассматривать в качестве молекулярного теста на качество удаления биопленки в модельном эксперименте. Источником бактериальной ДНК могут служить оставшиеся на поверхности клетки *E. coli* или их фрагменты, что оценивали PCR-RT-анализом.

Расчет, проведенный на основе данных PCR-RT-анализа, показывает, что содержание нуклеи-

новых кислот в исследуемых образцах бактериальной пленки в разы меньше, чем в тест-объекте с минимальным содержанием ДНК в пробе (0,001 нГ). Самый низкий уровень ДНК регистрируется в образце биопленки, отмытой водой из бытового трубопровода, что практически не оказывает дезинфицирующего эффекта. Этот факт можно объяснить тем, что популяция кишечной палочки находится на дне бактериальной пленки, что затрудняет доступ к ней лизирующего раствора. Другими словами, наблюдается характерная ситуация, когда матрикс биопленки купирует внешнее воздействие. Такую трактовку результатов PCR-RT подтверждают данные сканирующей электронной микроскопии (рис. 4).

На микрофотографиях (рис. 4) представлены изображения поверхности трубки циркуляционного реактора после лизирования клеточной массы для PCR-RT-анализа. Видно, что качество удаления кишечной палочки зависит от способа обработки биопленки. В образце, отмытом водой, наблюдается полная сохранность бактериальной пленки (рис. 4а), но после лизирования на поверхности остались отдельные клетки и их фрагменты (рис. 4г). Препарат, обработанный 10%-м водным раствором NaOH, выглядит менее плотным (рис. 4б), чем контрольный образец (рис. 4а), но все равно содержит большой объем клеточной массы. После лизирования на поверхности не на-

блюдается кишечная палочка, но видны фрак-
тальные структуры неопределенной природы
(рис. 4д). Возможно, это следы повреждения по-
верхности в результате длительного взаимодей-
ствия материала ПВХ-трубки с сильной щело-
чью. Видно (рис. 4в), что обработка био пленки
католизом удаляет молочнокислые бактерии,
оставляя фракцию *E. coli*. После лизирования на
поверхности трубки не остается клеточной ком-
поненты (рис. 4е).

Завершая обсуждение, можно отметить следу-
ющее. В комплексе ультраструктурный и генети-
ческий подходы могут быть использованы для
изучения эффективности процедуры удаления
бактериальной пленки с поверхности. В этом слу-
чае критерием служит визуализация клеточной
фракции или наличие ДНК характерной бакте-
рии. В данном исследовании использовали *E. coli*
в качестве такого микроорганизма-маркера, ко-
торый демонстрирует качество, полезное для мо-
дельного эксперимента. Помимо адгезии кишеч-
ная палочка крепится механически посредством
отростка, используя его в качестве якоря. Поэто-
му для разрушения био пленки, содержащей эту
бактерию, дезинфицирующий раствор должен
обладать более универсальными свойствами, чем
при удалении пленки, сформированной только
молочнокислыми бактериями.

Исследование выполнено при финансовой
поддержке Российского научного фонда (проект
№ 17-76-20014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. R. Garrett, M. Bhakoo, and Z. Zhang, *Progr. Natu-
ral Sci.* **18**, 1049 (2008).
2. M. E. Shirtliff, J. T. Mader, and A. K. Camper, *Chem.
Biol.* **9**, 859 (2000).
3. J. W. Costerton, *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**, 217
(1999).
4. W. M. Dunne, *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 155 (2002).
5. A. Bridier, R. Briandet, V. Thomas, and F. Dubois-
Brissonnet, *Biofouling* **27**, 1017 (2011).
6. D. Nguyen, A. Joshi-Datar, F. Lepine, et al., *Science*
334, 982 (2011).
7. K. Drescher, Y. Shen, B. L. Bassler, and H. A. Stone,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **110**, 4345 (2013).
8. N. D'Atanasio, A. Capezzone de Joannon, G. Manga-
no, et al., *Wounds* **27**, 265 (2015).
9. T. E. Cloete, M. S. Thantsha, M. R. Maluleke, and R.
Kirkpatrick, *J. Appl. Microbiol.* **107**, 379 (2009).
10. V. M. Bakhir and A. G. Pogorelov, *Int. J. Pharm. Res.
& Allied Sci.* **7**, 41 (2018).
11. C. Ludecke, K. D. Jandt, D. Siegmund, et al., *PLOS
One* **9**, e84837 (2014).
12. S. A. Cruz, R. Popat, M. T. Rybtko, et al., *Biofouling*
28 (8), 835 (2012).
13. C. Rollet, L. Gal, and J. Guzzo, *FEMS Microbiol.
Lett.* **290**, 135 (2009).
14. A. G. Pogorelov, V. B. Gavriluk, V. N. Pogorelova,
and B. K. Gavriluk, *Bull. Exp. Biol. Med.* **154**, 167
(2012).
15. A. G. Pogorelov, I. V. Chebotar, and V. N. Pogorelova,
Bull. Exp. Biol. Med. **157**, 711 (2014).

Biophysical Approach for Disintegration of Bacterial Film Formed on the Surface

A.G. Pogorelov, A.L. Kuznetsov, V.N. Pogorelova, O.A. Suvorov, A.I. Panait, and M.A. Pogorelova

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The action of electrochemically activated water on the fine structure of biofilms generated by the plankton forms of lacto bacteria and *E. coli* was investigated. Bacterial films have been grown on the inner tuber surface of flow reactor imitating pipeline. Applying scanning electron microscopy approaches, the detailed relief of biofilms was visualized. The catholite treatment followed with anolite was exhibited to destroy both the organic polymer matrix of biofilms and bacterial cells embedded in the matrix. This work was supported by the Russian Science Foundation grant № 17-76-20014.

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