

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

СПЕЦИФИКА ФОРМИРОВАНИЯ МУЛЬТИВИДОВЫХ МИКРОБНЫХ
БИОПЛЕНОК НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНА

© 2020 г. М. В. Журина^а, * А. Ю. Каллистова^а, А. Е. Панюшкина^а, А. В. Ганнесен^а,
С. В. Мартьянов^а, В. А. Герасин^б, Н. А. Сивов^б, В. А. Тихомиров^б, В. К. Плакунов^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, ГСП-1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: mzhurik@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2020 г.

После доработки 18.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

Изучены особенности формирования трехвидовых биопленок на поверхности композитного материала на основе полиэтилена высокого давления из смеси планктонных чистых культур микроорганизмов, способных к его биокоррозии. Впервые для подобной системы установлено, что аскомицет *Yarrowia lipolytica* выполняет роль “первичного колонизатора”, образующего агрегаты с грамотрицательными бактериями *Pseudomonas aeruginosa* или *Chromobacterium violaceum*. Показано, что биоцидные соединения гуанидинового ряда, добавленные к полиэтилену высокого давления в составе комплексного наполнителя, способны избирательно подавлять рост биопленок некоторых микроорганизмов, не влияя на начальные этапы их адгезии, а также на рост планктонных культур. Наиболее чувствительными к воздействию этих биоцидов оказались грамположительные бактерии *Kocuria*.

Ключевые слова: мультивидовые биопленки, динамика формирования биопленок, первичные колонизаторы, биоцидные наполнители, композитные материалы, защита от биокоррозии

DOI: 10.31857/S0026365620040187

Широко распространенный стандартный метод количественного определения микробных биопленок основан на их формировании в ячейках пластиковых (как правило, сделанных из полистирола) планшетов с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым (КФ) (или некоторыми другими красителями), после чего краситель экстрагируется подходящим растворителем, а оптическая плотность раствора измеряется спектофотометрически (или флуориметрически, если краситель обладает флуоресценцией) (Coenye, Nelis, 2010). Поскольку положительно заряженные молекулы КФ окрашивают как живые, так и мертвые клетки, а также внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ) биопленки, использование этого красителя дает представление только об общем количестве биопленочного материала, а не о функционально активных биопленочных микроорганизмах (Pitts et al., 2003). Этот и другие недостатки данного метода, неоднократно отмеченные в литературе (Vandecandelaere et al., 2016), привели к необходимости изготовления модифицированных планшетов и использования

других подходов (Hassanpourfard et al., 2014), а также разработки альтернативных методов измерения формирования биопленок с использованием тефлоновых носителей или фильтров из стекловолокна (Плакунов и соавт., 2016).

Если процесс адгезии микроорганизмов и формирования ими биопленок на поверхности полистирола изучен достаточно подробно, то в отношении других синтетических пластмасс данных явно недостаточно. Особенно мало сведений, описывающих формирование микробных биопленок (тем более, мультивидовых) на поверхности полиэтилена (ПЭ), хотя этот пластик занимает одно из первых мест по использованию в технике, в медицине и в быту. Такие данные имеют не только теоретическое значение, но важны также и для практического использования ПЭ, как с точки зрения утилизации его отходов, так и защиты технических изделий от микробной биокоррозии.

В задачу данной работы входило изучение закономерностей формирования мультивидовых биопленок на поверхности немодифицированной

го (незащищенного) и модифицированного (защищенного) ПЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка микробных культур. Использовали микроорганизмы из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН: *Kocuria rhizophila* 4A-2G, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Yarrowia lipolytica* 367-3 (Мартьянов и соавт., 2015; Ганнесен и соавт., 2015), а также *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 WT из коллекции профессора И.А. Хмель (Институт молекулярной генетики РАН) и *Micrococcus luteus* НВ 3.2.1 (выделен из тропических почв Вьетнама; штамм получен из коллекции микроорганизмов лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН). Микроорганизмы хранили при температуре 4–5°C (кроме штамма *C. violaceum*, который хранили при комнатной температуре) на столбиках (5 мл) полужидкой среды LB (Lysogeny Broth) по Lennox (“Диаэм”, Россия) под вазелиновым маслом. В качестве инокулята в опытах с биопленками использовали 24-часовые культуры, выращенные в жидкой среде LB на качалке (150 об./мин) при 30°C, как в предыдущих перечисленных работах.

Перед экспериментом культуры рассеивали методом “истощающего штриха” на поверхности плотной среды LA (среда LB с добавлением 2.5% агара) и инкубировали 48 ч при 30°C. Чашки с выросшими культурами хранили 2–3 нед. при комнатной температуре в герметичных сосудах. Для эксперимента выбирали характерные колонии, которые засеивали на жидкую среду LB и выращивали 24 ч при 30°C на качалке (150 об./мин). Полученные культуры использовали в качестве тест-объектов для измерения динамики формирования моно и мультивидовых биопленок на поверхности ПЭ.

Тестируемые образцы полиэтилена и композитных материалов на его основе. В большинстве исследований, посвященных формированию микробных биопленок на поверхности ПЭ, используемый субстрат не охарактеризован с необходимой полнотой. Между тем, свойства поверхности ПЭ и закономерности формирования на ней биопленок сильно зависят от минорных добавок и способа формирования полиэтиленовой пленки, что не позволяет сравнивать результаты, полученные в разных исследованиях. Поэтому мы уделили большое внимание описанию технологии изготовления используемых нами образцов ПЭ.

В качестве субстрата для изучения процесса формирования мультивидовых биопленок выбран ПЭ высокого давления марки 15803–020 с молекулярной массой ~10000–500000, степень кристалличности 30%, произведенный согласно

ГОСТ 16337–77 на предприятии ПАО “Казаньоргсинтез” (в дальнейшем тексте обозначен как ПЭ-158). Полимерная цепь имеет нерегулярное строение: на 8–40 атомов углерода основной цепи приходится одна боковая метильная группа.

В качестве биоцидных добавок использовали полимеры и сополимеры, обладающие значительным антимикробным действием. При выборе исходили из необходимости присутствия ионных групп, проявляющих заметную биоцидную активность. Выбор был сделан в пользу полимерных солей гуанидинового ряда. Поскольку такие соли хорошо растворимы в воде, но не в гидрофобной фазе ПЭ, введение этих полиэлектролитов в полиолефин требовало отдельного решения.

Для равномерного распределения полиэлектролитов в полимерной матрице и обеспечения их пролонгированного действия, биоциды удобно вводить в полимерные матрицы в составе комплексного наполнителя, содержащего нерастворимый носитель и химически привитый к нему полигуанидин. В качестве носителей для иммобилизации биоцидных полимеров представляется перспективным использование слоистых силикатов, например, монтмориллонита. Поэтому в качестве носителя биоцидной добавки был использован натриевый монтмориллонит марки Cloisite Na⁺ (ЕКО 95 смоль/кг) фирмы “Southern Clay Products” (США) (далее – ММТ). При проведении модификации с последующим центрифугированием суспензии и отделения модифицированной глины от маточного раствора, в составе комплексного наполнителя содержится только химически адсорбированный полигуанидин (Герасин и соавт., 2019).

Для преодоления фазовой несовместимости применяли компатибилайзеры – функциональные добавки, имеющие полярные группы, для обеспечения адсорбции на поверхности слоистых силикатов и длинные участки цепей, совмещающиеся с матричным полимером. Компатибилайзеры предназначены для обеспечения равномерного диспергирования наноразмерного наполнителя и образования прочных связей “полимер–наполнитель”. В работе с этой целью использовали Метален F1018 производства “Метаклэй” (Россия).

Для смешивания компонентов применяли лабораторный двухшнековый микроэкструдер MiniLab HAAKE Rheomex CTW5 (Германия). Пленки для экспериментов получали методом горячего прессования при давлении 0.5 МПа.

Всего в данной серии экспериментов использовали три биоцидных комплексных наполнителя:

1) гидрохлоридная соль полигексаметиленгуанидина (ПГМГ-ГХ), адсорбированная на ММТ в соотношении мас. % 30/70 (Б-1);

2) сополимер метакрилоильной производной гидрохлорида гуанидина с диаллильной производной диметиламмоний хлорида (ПМГГХ – ПДАДМАХ), соотношение мас. % 67/33, адсорбированный на ММТ мас. % 30/70 (Б-3);

3) сополимер метакрилоильной производной гуанидина с полиметакриламидом (ПМГГХ – ПМААм), соотношение мас. % 38/62, адсорбированный на ММТ мас. % 30/70 (Б-4).

Содержание биоцидной комплексной добавки и компатибилайзера составляло по 5%, что соответствует общему содержанию биоцида в композите 1.5 мас. %.

Контрольный и холостой образцы изготавливали аналогично, но в контрольный образец не вводили биоциды, а холостой образец не подвергали воздействию микроорганизмов.

Подготовка тестируемых образцов. Из полученных методом горячего прессования пленок толщиной 120–250 мкм нарезали полоски 1 × 2 см, помещали на бумажные фильтры в чашки Петри и стерилизовали действием УФ светом в течение 15 мин в ультрафиолетовом стерилизаторе “Уфikon” с бактерицидной лампой SYLVANIA (Германия), генерирующей излучение с длиной волны 254 нм мощностью 9 Вт.

Стерильные образцы пленок, полученных методом горячего прессования, хранили при комнатной температуре в герметизированных парафильмом чашках Петри.

Измерение динамики формирования биопленок на поверхности ПЭ. В пробирки с 5 мл стерильной среды LB вносили стерилизованные УФ пластинки ПЭ и 50 мкл посевного материала. В случае моновидовых биопленок использовали 24-часовые культуры изучаемых бактерий, которые разбавляли стерильной средой LB до условной (светопоглощение + светорассеяние) оптической плотности 2 (при 540 нм). Для получения мультивидовых биопленок эти разбавленные культуры предварительно смешивали в равных пропорциях. Использовали два варианта сочетаний, содержащих по три культуры (большее количество культур в составе биопленок вызывает серьезные трудности при их раздельном количественном учете). Эти культуры, как было показано в предварительных опытах, обладают среди изученных ранее (более 30 представителей различных физиологических групп микроорганизмов), наиболее выраженной способностью к биопленкообразованию и биокоррозии поверхности ПЭ. Первый вариант трехвидовой биопленки (ТБ-1) включал: *Y. lipolytica* 367-3 + *P. aeruginosa* PAO1 + *K. rhizophila* 4A-2G; второй

вариант трехвидовой биопленки (ТБ-2) включал: *Y. lipolytica* 367-3 + *C. violaceum* ATCC 31532 (WT) + *M. luteus* НВ 3.2.1. Данные культуры большей частью выделены из пластовых вод различных нефтяных месторождений или почвы и способны утилизировать парафины. Одно из оснований выбора перечисленных культур заключается в предположении, что некоторые из ферментов (в частности, оксигеназы, гидроксилазы и другие), образуемых этими микроорганизмами и участвующих в окислении парафинов, могут по аналогии с ними вызывать окисление и гидролиз углеводородного полимера ПЭ (Yoon et al., 2012; Raddadi, Fava, 2019; Журина и соавт., 2020). Образцы (включая “холостые” варианты, инкубируемые в среде без микроорганизмов) культивировали 1, 3, 6 и 24 ч при комнатной температуре (около 24°C) на качалке (180 об./мин), сливали планктонную культуру для измерения ее оптической плотности, осторожно промывали образцы ПЭ дистиллированной водой и высушивали на воздухе при 37°C в течение 1 ч. Такая обработка обеспечивала фиксацию биопленок на поверхности ПЭ, позволяющую производить их окрашивание и микроскопирование без потери материала биопленок.

Определение количества, состава биопленок и численности входящих в них микроорганизмов. Определение общего количества образовавшихся биопленок осуществляли путем окрашивания кристаллическим фиолетовым (КФ), по ранее описанной нами методике (Плакунов и соавт., 2016; Журина и соавт., 2020).

Для определения численности и состава популяций микроорганизмов, формирующих мультивидовые биопленки в условиях описанных экспериментов, использовали методы микроскопирования и подсчет числа колониеобразующих единиц (КОЕ) стандартным методом разведений. Микроскопический анализ производили непосредственно на образцах ПЭ после окрашивания КФ или флуоресцентными красителями. Для определения числа КОЕ неокрашенные биопленки смывали и суспендировали в среде LB полужесткой стерильной кисточкой из натуральной шерсти с последующим диспергированием с помощью шейкера Vortex-ZX3. Полноту удаления биопленок с образцов ПЭ контролировали их окрашиванием КФ. Поскольку в экспериментах использовали трехвидовые биопленки, простой подсчет колоний на плотной среде затруднителен из-за возможного перекрытия их роста (особенно в случае подвижных форм грамотрицательных бактерий). Поэтому использовали селективные среды с антибиотиками. Как было показано ранее (Мартыанов и соавт., 2015; Ганнесен и соавт., 2015), антибиотик азитромицин в концентрации не выше 1 мкг/мл полностью подавляет рост планктонных культур

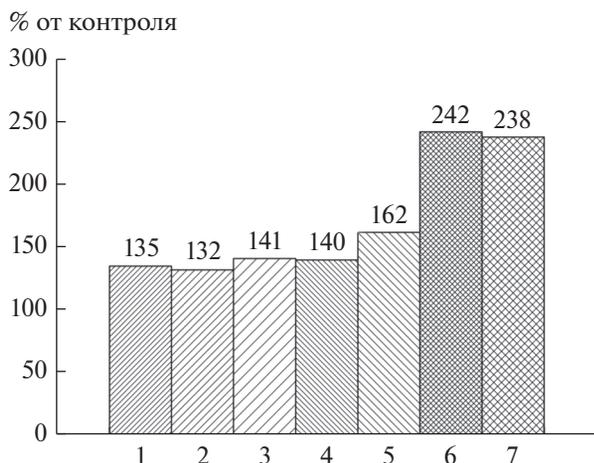


Рис. 1. Определение оптическим экспресс-методом степени биокоррозии поверхности полиэтилена. Монокультурные биопленки: 1 – *K. rhizophila* 4A-2G; 2 – *M. luteus* НВ 3.2.1; 3 – *P. aeruginosa* PAO1; 4 – *C. violaceum* ATCC 31532 WT; 5 – *Y. lipolytica* 367-3. Трехвидовые биопленки: 6 – *Y. lipolytica* 367-3 + *P. aeruginosa* PAO1 + *K. rhizophila* 4A-2G (ТБ-1); 7 – *Y. lipolytica* 367-3 + *C. violaceum* ATCC 31532 (WT) + *M. luteus* НВ 3.2.1 (ТБ-2).

использованных грамположительных бактерий, но не влияет на рост грамотрицательных бактерий. В условиях модельных опытов эти концентрации азитромицина полностью предотвращали формирование колоний на плотной среде LA в случае *K. rhizophila* 4A-2G и *M. luteus* НВ 3.2.1, не влияя на рост остальных культур. Дополнительное введение в среду 10 мкг/мл амфотерицина полностью предотвращало формирование колоний *Y. lipolytica* 367-3. Таким образом, в этом варианте опыта можно было подсчитать число КОЕ для *P. aeruginosa* PAO1 или *C. violaceum* ATCC 31532 (WT). На среде, содержащей 10 мкг/мл азитромицина, полностью предотвращался рост всех бактериальных штаммов, что позволяло определить число КОЕ для *Y. lipolytica* 367-3. Наконец, в присутствии одного только амфотерицина (10 мкг/мл) оказалось возможным определить число КОЕ для сильно различающихся по морфологии колоний бактериальных пар: *K. rhizophila* 4A-2G + *P. aeruginosa* PAO1 или *M. luteus* НВ 3.2.1 + *C. violaceum* ATCC 31532 (WT). Время выращивания колоний в этих случаях не должно превышать 48 ч при 30°C для предотвращения слияния колоний подвижных форм бактерий. Во всех случаях природу колоний контролировали путем микроскопирования сделанных из них мазков. Для подсчета числа КОЕ учитывали высевы не менее чем из трех разведений (каждое в трех повторностях), в которых число вырастающих на плотной среде колоний находилось в пределах 20–200. Контрольные подсчеты числа КОЕ для индивидуальных культур (в отсутствие

антибиотиков) показали, что в использованных концентрациях данные антибиотики действуют избирательно и не подавляют рост подсчитываемых микроорганизмов.

Микроскопия. Для анализа методом эпифлуоресцентной микроскопии фиксированные образцы биопленок на ПЭ окрашивали красителем SYTO™ 9 Green по фирменной методике (“ThermoFisher Scientific” <https://www.thermofisher.com/ru/ru/homelife-science/cell-analysis/fluorophores/syto-9.html>). Клетки визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager.M2 (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия), оснащенного цифровой камерой 503 topo и светофильтром Zeiss 38 (максимум возбуждения – 470 нм, максимум эмиссии – 525 нм). Использовали иммерсионный объектив 100×. Фотографии обрабатывали с использованием программного обеспечения ZEN 2 (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия). Микроскопию с применением фазового контраста проводили на микроскопе Olympus CX41 (Япония). Камера Olympus C5060-ADU (Япония). ПО ImageScope Lite (“ImageScope Color Application”, Россия). Препарат ПЭ с биопленками помещали на предметное стекло с каплей воды, накрывали покровным стеклом и наблюдали с использованием иммерсии (объектив 100×). Полученные фотографии в случае необходимости контрастировали с помощью графической программы embossing Photoshop CS6 Extended.

Статистическая обработка. Поскольку, как и в предыдущих наших работах, тест на нормальность закона варьирования данных дал отрицательный результат, для оценки достоверности различий применяли непараметрические критерии (Каллистова и соавт., 2019), в данном случае U-критерий Манна–Уитни–Вилкоксона при $p < 0.05$. Как известно (Ашмарин, Воробьев, 1962), в экспериментах при подсчете КОЕ варьирование данных, как правило, соответствует распределению Пуассона. В этом случае достоверность различий оценивали относительной ошибкой средней величины (медианы), при условии, что ее значение, не превышающее 15%, соответствует $p < 0.05$. Построение и сглаживание графиков проводили с использованием инструмента B-spline программы Origin-Lab 8.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как мы уже отмечали в разделе “Материалы и методы исследования”, при подборе сочетаний микроорганизмов учитывались их высокая биопленкообразующая и биокоррозионная активность, совместимость при формировании трехвидовых биопленок, а также возможность их отдельного количественного учета. На рис. 1 показаны результаты определения оптическим экс-

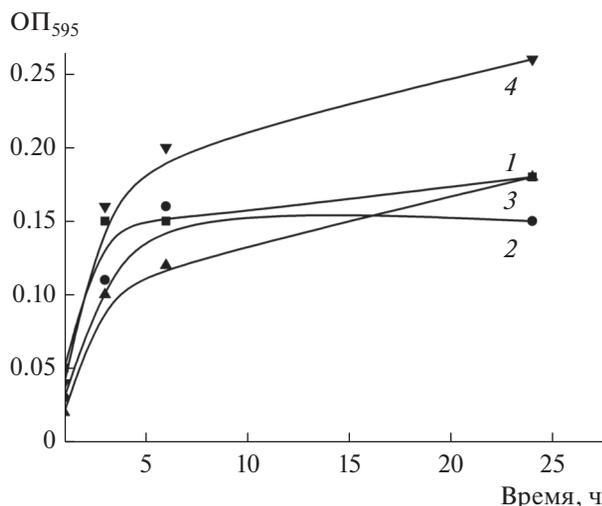


Рис. 2. Динамика формирования биопленок на поверхности ПЭ-158. 1 – *Y. lipolytica* 367-3; 2 – *P. aeruginosa* PAO1; 3 – *K. rhizophila* 4A-2G; 4 – трехвидовая смесь ТБ-1. Окрашивание КФ.

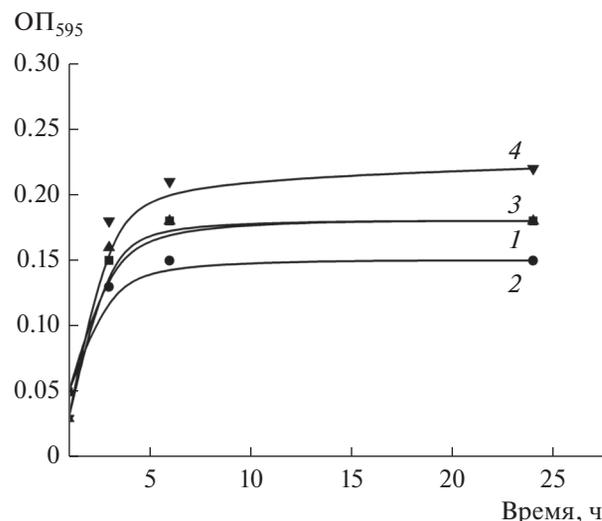


Рис. 3. Динамика формирования биопленок на поверхности ПЭ-158: 1 – *Y. lipolytica* 367-3; 2 – *C. violaceum* ATCC 31532 (WT); 3 – *M. luteus* НВ 3.2.1; 4 – трехвидовая смесь ТБ-2. Окрашивание КФ.

пресс-методом (Журина и соавт., 2020) шероховатости поверхности ПЭ-158, возникающей в результате биокоррозии под воздействием моно- и трехвидовых микробных биопленок, выбранных для детального изучения динамики их формирования.

При изучении динамики формирования биопленок получены результаты, представленные на рис. 2 и 3. Они показывают, что общее количество биопленочного материала через 1 ч инкубации со смесью планктонных культур очень невелико (окрашивание КФ сравнимо с окрашиванием холостого образца, инкубированного в отсутствие микроорганизмов). Активное формирование биопленок начинается через 3 ч инкубации с планктонными культурами и значительной величины достигает к 6 ч. Через 24 ч инкубации количество биопленок достигает максимума. Эти результаты в целом совпадают с полученными нами ранее (Стрелкова и соавт., 2012).

При изучении архитектуры биопленок уже на первых этапах их формирования, начиная с 3 ч инкубации, после завершения процесса обратной адгезии, который занимает около 1 ч, проявляется неравномерность их распределения на поверхности ПЭ. В результате даже в случае контрольных образцов ПЭ, не содержащих биоцидов, возникает сложная картина гетерогенности мультивидовых биопленок (рис. 4).

Подобная картина формирования биопленок на поверхности ПЭ, по-видимому, обусловлена несколькими причинами. Из них важнейшими являются две: неравномерности поверхности данного субстрата, возникающие в процессе его приготов-

ления из расплава и стерилизации жестким ультрафиолетом (УФ), а также гетерогенность состава. Эти особенности зависят от типа ПЭ, поскольку на них могут влиять содержащиеся в нем минорные добавки. Можно полагать, что микроорганизмы используют разрывы полимерных цепей, наличие окисленных групп и двойных связей в полимере: кетонов, кислотных и сложноэфирных групп, гидроперекисей для инициации прикрепления к поверхности ПЭ и ускорения его деградации. Поскольку формирование биопленок на поверхности ПЭ (наряду с возможной секрецией микробных экзоферментов) являются необходимыми этапами процессов биодеградации ПЭ, они заслуживают тщательного изучения, как для разработки методов защиты ПЭ от биокоррозии, так и для ускорения микробного разложения его отходов (Khar'kova et al., 2019).

Изучение ранних этапов формирования мультивидовых биопленок показало, что важную роль в этих процессах играет аскомицетный компонент (рис. 5).

На рис. 5 видно, что *Y. lipolytica* 367-3 служит “первичным колонизатором” для грамотрицательного компонента *P. aeruginosa* PAO1, который концентрируется, в основном, вокруг клеток этих дрожжей, тогда как грамположительный компонент, *K. rhizophila* 4A-2G, формирует самостоятельные микроколонии. Очень близкая картина получена для начальных этапов формирования трехвидовой биопленки из смеси культур ТБ-2: в этом случае вокруг *Y. lipolytica* 367-3 концентрируются грамотрицательные *C. violaceus* WT, тогда как грамположительные *M. luteus* НВ 3.2.1 распо-

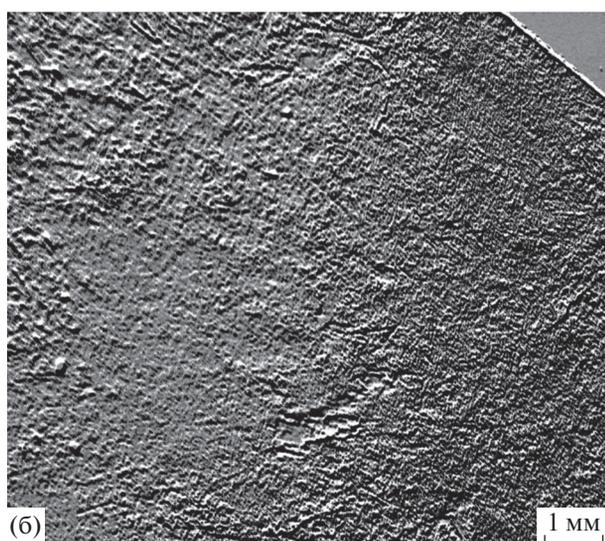
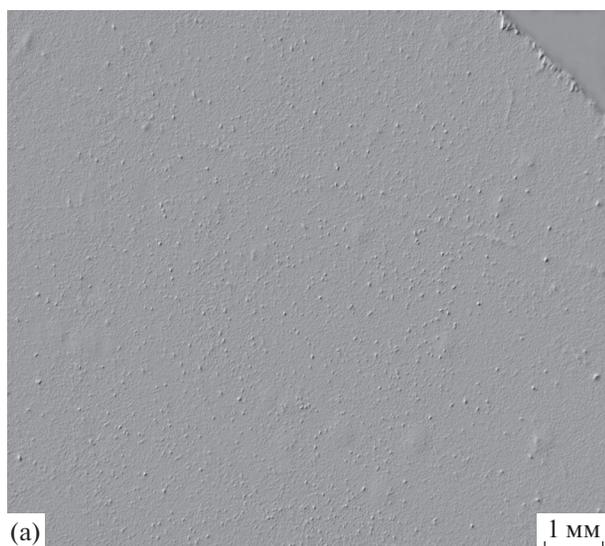


Рис. 4. Сравнение холостого и контрольного образцов ПЭ-158: а – холостой образец, инкубированный в среде LB без микроорганизмов; б – биопленка, сформированная за 24 ч на поверхности контрольного образца (без биоцидов) в присутствии трехвидовой смеси планктонных культур ТБ-1. Оба препарата контрастированы с помощью инструмента Photoshop CS6 Extended embossing (рельеф). Цифровой микроскоп Levenhuk DTX 500.

лагаются в виде изолированных микроколоний (не показано).

Для дальнейших исследований в качестве инструментов использовали перечисленные ранее катионные биоциды, обнаружившие в предварительных опытах высокую ингибиторную активность в отношении планктонных культур и моновидовых биопленок изучаемых микроорганизмов. Представляло интерес установить, проявляют ли эти биоциды какую-либо избирательность в отноше-

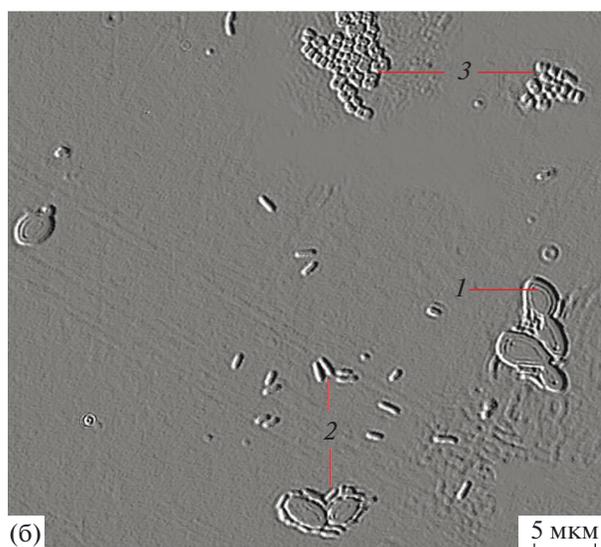
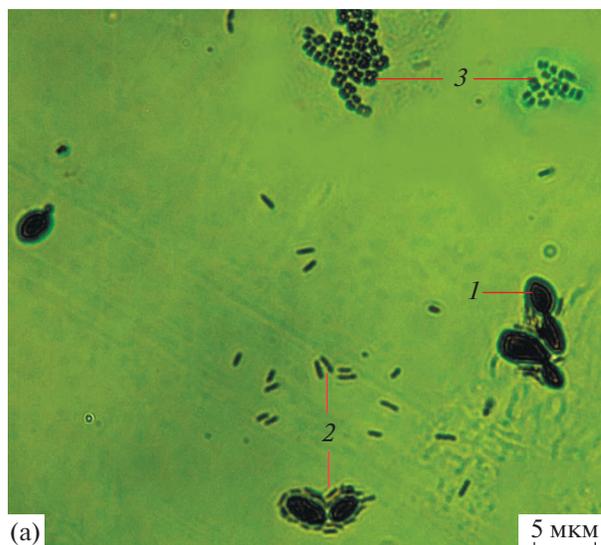


Рис. 5. Формирование мультивидовой биопленки через 3 ч инкубации со смесью планктонных культур ТБ-1: 1 – *Y. lipolytica* 367-3; 2 – *P. aeruginosa* PAO1; 3 – *K. rhizophila* 4A-2G; а – фазовый контраст, б – рельеф (embossing).

нии микробных компонентов трехвидовых биопленок, формирующихся в наших экспериментах.

Измерение общего накопления биопленок (матрикс + микробные клетки) путем окрашивания КФ после инкубации в трехвидовой смеси культур выявило различия в формировании биопленок на поверхности контрольного и содержащих биоциды образцов ПЭ (рис. 6 и 7).

Результаты, представленные на рис. 6 и 7, показывают, что общее количество биопленочного материала через 1 ч инкубации со смесью планктонных культур, как мы уже отмечали, невелико и практически не зависит от присутствия биоцидов. Можно полагать, что стадия адсорбции и обратимой адгезии

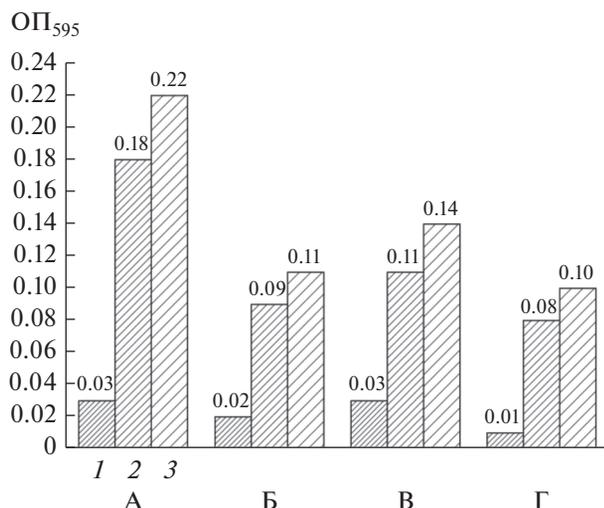


Рис. 6. Количественная оценка формирования биопленок на поверхности ПЭ-158 по окрашиванию КФ в присутствии трехвидовой смеси планктонных культур ТБ-1: контроль, не содержащий биоциды (А); вариант, содержащий биоцид Б-1 (Б); вариант, содержащий биоцид Б-3 (В); вариант, содержащий биоцид Б-4 (Г). Время инкубации: 1 – 1 ч; 2 – 3 ч; 3 – 24 ч.

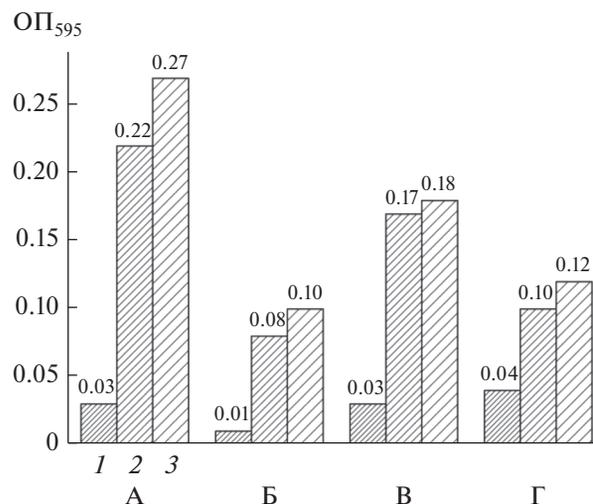


Рис. 7. Количественная оценка формирования биопленок на поверхности ПЭ-158 по окрашиванию КФ в присутствии трехвидовой смеси планктонных культур ТБ-2: контроль, не содержащий биоциды (А); вариант, содержащий биоцид Б-1 (Б); вариант, содержащий биоцид Б-3 (В); вариант, содержащий биоцид Б-4 (Г). Время инкубации: 1 – 1 ч; 2 – 3 ч; 3 – 24 ч.

микроорганизмов нечувствительны к использованному биоцидам. Однако уже через 3 ч инкубации со смесью планктонных культур, когда наступает начальная стадия формирования биопленочного фенотипа (Стрелкова и соавт., 2012), проявляется ингибиторное действие всех использованных биоцидов. К 24 ч инкубации со смесью планктонных культур в присутствии биоцидов количество биопленок возрастает несущественно, но, как показывает микроскопический контроль, проявляются различия в их микробном составе. По-видимому, использованные биоциды проявляют селективную и разную по величине ингибиторную активность в отношении исследуемых микроорганизмов. Эта закономерность, в основном, соблюдается как для смеси культур ТБ-1, так и для смеси ТБ-2.

Качественный состав формирующихся биопленок изучали методом ЭФМ (рис. 8), а количественно наличие конкретных микроорганизмов определяли избирательным подсчетом числа КОЕ (рис. 9 и 10).

Поскольку, как мы уже отмечали, распределение биопленок на поверхности ПЭ носит резко выраженный неравномерный характер, количественный учет микроорганизмов путем прямого подсчета не представляется возможным. Поэтому мы использовали определение числа КОЕ на селективных средах с антибиотиками, как это описано в разделе “Материалы и методы”. Результаты представлены на рис. 9 и 10.

Важно отметить, что присутствие биоцидов в образцах ПЭ практически не влияло на рост планктонных культур микроорганизмов, контактировавших с этими образцами. Лишь в случае биоцида Б-4 наблюдалось незначительное, статистически недостоверное (на 10–15%) снижение роста смеси трехвидовых культур.

Подводя итог, необходимо отметить, что формирование мультивидовых биопленок на поверхности исследованных образцов ПЭ обнаруживает важные особенности. Во-первых, начальные этапы формирования биопленок, которые, в основном, зависят от структурных особенностей использованных микроорганизмов, оказались нечувствительными к действию биоцидов на основе полимерных солей гуанидинового ряда, обладающих высокой антимикробной активностью (Shatalov et al., 2017; Герасин и соавт., 2019). Однако процессы последующего перехода микроорганизмов к “биопленочному” фенотипу и формированию зрелых биопленок в разной степени чувствительны к действию использованных биоцидов, что, несомненно, связано с различиями в природе регуляторных систем, участвующих на поздних этапах перехода бактерий к “прикрепленному” способу существования. Возникает необходимость расшифровки механизмов этого ингибирования, которое может способствовать получению новых антибиопленочных агентов. Для этого необходимо выявление ключевых структур, ответственных

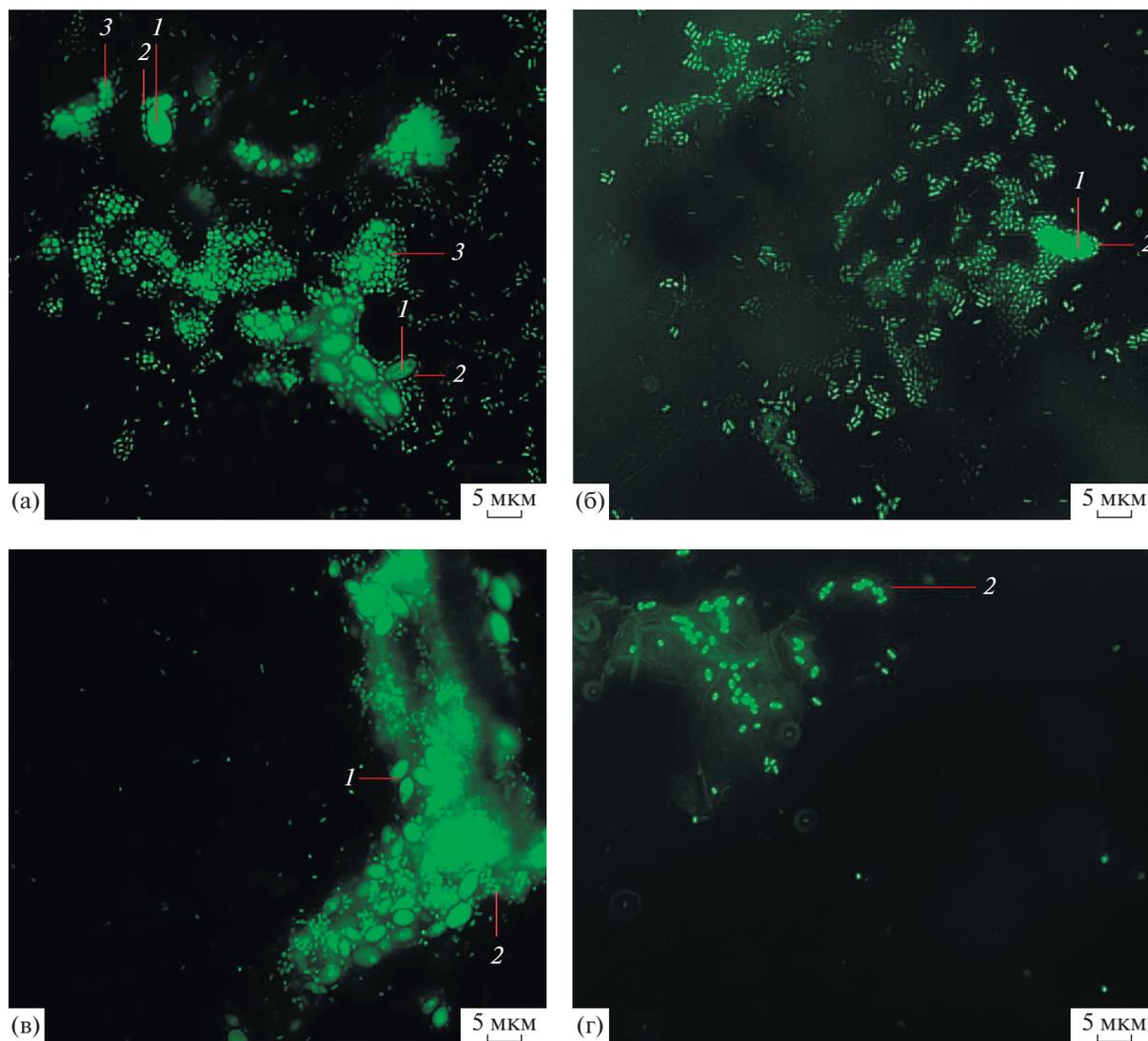


Рис. 8. Влияние биоцидов на состав трехвидовых биопленок ТБ-1: а – контроль без биоцидов; б – в присутствии биоцида Б-1; в – в присутствии биоцида Б-3; г – в присутствии биоцида Б-4. 1 – *Y. lipolytica* 367-3; 2 – *P. aeruginosa* PAO1; 3 – *K. rhizophila* 4A-2G.

за ингибирование биопленкообразования, что потребует исследований широкого круга аналогичных биоцидов, различающихся химической структурой.

В задачу данной работы не входило определение биокоррозионного воздействия изучаемых микроорганизмов на образцы ПЭ, поскольку для выявления повреждений требуется не менее 5–7 сут даже при использовании экспресс-метода (Журина и соавт., 2020). Целью работы было выявление специфики формирования мультивидовых биопленок на поверхности ПЭ, содержащего и не содержащего биоцидные агенты. Однако очевидно, что полученные нами результаты, кроме уточнения механизмов формирования мультивидовых микробных биопленок на поверхности ПЭ-158, будут

полезны как при разработке рекомендаций для создания методов утилизации отходов этого пластика, так и защиты технических изделий из ПЭ от микробных повреждений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ МК-18-29-05048 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

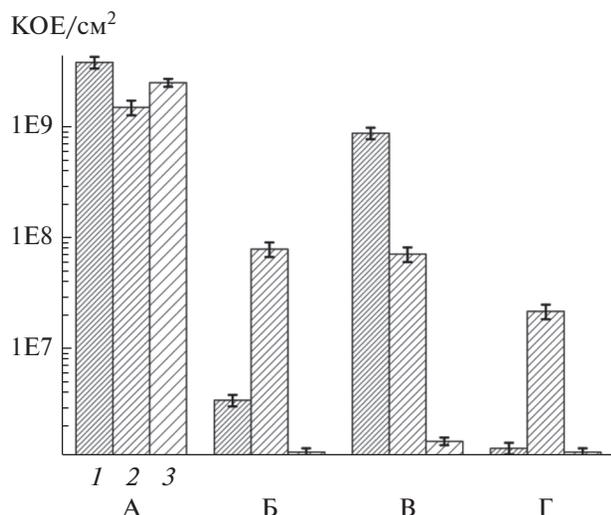


Рис. 9. Число КОЕ в трехвидовой микробной биопленке ТБ-1 через 24 ч инкубации в пересчете на 1 см² пластинки ПЭ-158: контроль (А); в присутствии биоцида Б-1 (Б); в присутствии биоцида Б-3 (В); в присутствии биоцида Б-4 (Г). 1 – *Y. lipolytica* 367-3; 2 – *P. aeruginosa* PAO1; 3 – *K. rhizophila* 4A-2G. Указана относительная ошибка медианы при $p < 0.05$.

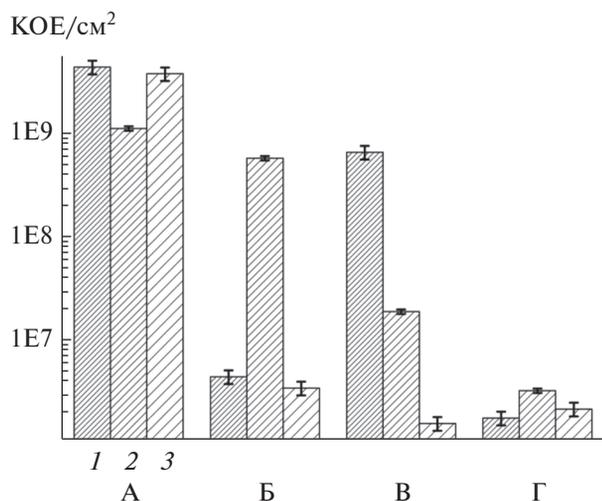


Рис. 10. Число КОЕ в трехвидовой микробной биопленке ТБ-2 через 24 ч инкубации в пересчете на 1 см² пластинки ПЭ-158: контроль (А); в присутствии биоцида Б-1 (Б); в присутствии биоцида Б-3 (В); в присутствии биоцида Б-4 (Г). 1 – *Y. lipolytica* 367-3; 2 – *C. violaceum* WT; 3 – *M. luteus* HB 3.2.1. Указана относительная ошибка медианы при $p < 0.05$.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Государ-

ственное издательство медицинской литературы, 1962. 182 с.

Герасин В.А., Сивов Н.А., Меньшев М.Р., Менделеев Д.И., Яковлева А.В., Сердюков Д.В. Патент № 2679147 от 28.11.2017 “Нанокпозиционный биоцидный материал” // Бюлл. изобр. № 4. 06.02.2019.

Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Плакунов В.К. Экспресс-метод определения взаимосвязи биокоррозии полиэтилена биопленками *Chromobacterium violaceum* с их способностью формировать внеклеточный полимерный матрикс // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 52–58.

Zhurina M.V., Gannesen A.V., Martyanov S.V., Plakunov V.K. Express method for determining the relation between polyethylene biocorrosion by *Chromobacterium violaceum* biofilms and their ability to form extracellular matrix // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 44–49.

Каллистов А.Ю., Сабреков А.Ф., Гончаров В.М., Пименов Н.В., Глаголев М.В. К вопросу об использовании статистического анализа при интерпретации результатов экспериментов в области экологической микробиологии // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 230–239.

Kallistov A.Yu., Sabrekov A.F., Goncharov V.M., Pimenov N.V., Glagolev M.V. On the application of statistical analysis for interpretation of experimental results in environmental microbiology // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 232–239.

Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 484–480.

Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 509–513.

Стрелкова Е.А., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биопленок // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 282–285.

Strelkova E.A., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Stimulation of biofilm formation by antibiotics // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 259–262.

Coenye T., Nelis H.J. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation // J. Microbiol. Methods. 2010. V. 83. P. 89–105.

Hassanpourfard M., Sun X., Valiei A., Mukherjee P., Thundat T., Liu Y., Kumar A. Protocol for biofilm streamer formation in a microfluidic device with micro-pillars // J. Vis. Exp. 2014. V. 90. <https://doi.org/10.3791/51732>

Khar'kova E.M., Mendeleev D.I., Guseva M.A., Gerasin V.A. Structure and properties of polymer-polymer composites based on biopolymers and ultra-high molecular weight polyethylene obtained via ethylene in situ polymerization // J. Polym. Environ. 2019. V. 27. P. 165–175. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1326-0>

Pitts B., Hamilton M.A., Zilver N., Stewart P.S. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal // J. Microbiol. Methods. 2003. V. 54. P. 269–276.

Raddadi N., Fava F. Biodegradation of oil-based plastics in the environment: existing knowledge and needs of research and innovation // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 679. P. 148–158.

Shatalov D.O., Kedik S.A., Zhavoronok E.S., Aydakova A.V., Ivanov I.S., Evseeva A.S., Beliakov S.V., Biryulin S.I., Kovalenko A.V., Mikhailenko E.N. The current state and development of perspectives of application of synthetic antimicro-

bial agents // *Polymer Scie. Series D.* 2017. V. 10. P. 293–299.

Yoon M.G., Jeon H.J., Kim M.N. Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and *AlkB* cloned recombinant cell // *J. Bioremed. Biodegrad.* 2012. V. 3. Art. 145. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000145>

Vandecandelaere I., Van Acker H., Coenye T. A microplate-based system as *in vitro* model of biofilm growth and quantification // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1333. P. 53–66.

Specific Features of Formation of Multispecies Microbial Biofilms on Polyethylene Surface

M. V. Zhurina^{1,*}, A. Yu. Kallistova¹, A. E. Panyushkina¹, A. V. Gannesen¹, S. V. Mart'yanov¹, V. A. Gerasin², N. A. Sivov², V. A. Tikhomirov², and V. K. Plakunov¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: mzhurik@mail.ru

Received February 28, 2020; revised March 18, 2020; accepted March 27, 2020

Abstract—Patterns of formation of three-species biofilms on the surface of a LDPE-based composite material were studied using a mixture of planktonic cultures of microorganisms capable of degrading this polymer. This is the first report of the role of the ascomycete *Yarrowia lipolytica* as a primary colonizer in this system, forming aggregates with gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* or *Chromobacterium violaceum*. Addition of biocidal compounds of the guanidine type to LDPE as a component of the filling agent was shown to result in selective suppression of biofilm growth of some microorganisms, while it had no effect on the initial stages of adhesion and on planktonic growth of the cultures. Gram-positive bacteria of the genus *Kocuria* exhibited the highest sensitivity to these biocidal agents.

Keywords: multispecies biofilms, dynamics of biofilm formation, primary colonizers, biocidal filling agents, composite materials, protection from biocorrosion