

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЙ И ОЦЕНКА ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К БИОЦИДАМ

The article is devoted to the problem of bacteria biofilms formation and methods of their studies. The objective of work is a viability of microorganisms' estimation under biocides action on biofilms in comparison with water media. The viability and activity of microorganisms were studied by reductase method. It has been shown that biocides decrease reductase activity of bacteria, cause cells association and their conversion in metabolic, but non-cultivable condition. The resistance of microorganisms to biocides increases in ten times when bacteria are in biofilms comparing with water media and depends on biocides type and concentration.

Введение. Предотвращение биоповреждений различных материалов является одной из актуальных экономических проблем, связанных с потерей, выходом из строя и сокращением срока службы материалов и оборудования, приводящим к техногенным катастрофам, а также загрязнению окружающей среды.

Основным способом борьбы с нежелательными микроорганизмами в настоящее время является использование химических биоцидных веществ. Существенный недостаток данного способа заключается в снижении эффективности действия биоцидных веществ с течением времени. Главная причина потери активности антисептиков связана с адаптацией микроорганизмов к часто используемым антимикробным веществам.

Повышение эффективности борьбы с нежелательной микрофлорой возможно только на основе изучения механизмов и закономерностей адаптации клеток, которые в настоящее время еще до конца не ясны.

Известно, что адаптация микроорганизмов может проявляться путем:

- возрастания резистентности микроорганизмов к воздействию фактору;
- изменения морфологических свойств клеток;
- увеличения ростовой активности микроорганизмов;
- сокращения длительности фазы задержки роста клеток;
- образования ассоциатов, агрегатов, биопленок и других структурированных форм микроорганизмов.

В борьбе за выживание в неблагоприятных условиях среды микроорганизмы могут выбирать индивидуальную или коллективную форму защиты, однако коллективный способ сохранения считается более предпочтительным. По современным представлениям 95–99% микроорганизмов в природе функционирует в составе сообществ.

Микроорганизмы постоянно обмениваются между собой информацией путем выделения в окружающую среду молекул, которые управляют их поведением. В неблагоприятных условиях одиночные клетки бактерий при концентрации выше 10^6 кл./см³ объединяются в псевдомногочелюточный организм, который ведет

себя, как одно целое. Это явление, открытое в 90-х гг. XX в. получило название Quorum sensing и представляет собой пример коллективной защиты и адаптации микроорганизмов.

Свойства клеток существенно меняются в зависимости от того, находятся они в свободном или иммобилизованном состоянии [1, 2].

Биопленки представляют собой пространственно и метаболически структурированные сообщества клеток, заключенные в межклеточный матрикс и расположенные на границе раздела фаз. В последнее время биопленкам микроорганизмов уделяется пристальное внимание [3].

Образование биопленок и биообрастаний является основной причиной биокоррозии, нарушения массо- и энергопереноса в процессах мембранной фильтрации, в сетях водо- и тепло-снабжения. Биообрастание также ухудшает органолептическое качество и безопасность воды. Представляет большой научный и практический интерес изучение закономерностей роста, развития и функционирования биопленок для предотвращения их образования.

Основная часть. Существуют определенные трудности в изучении микроорганизмов в составе биопленок, поскольку они ведут себя не как отдельные клетки, а как единое целое, и традиционно используемые методы культивирования микроорганизмов на питательном агаре не применимы. Это требует использования других методических подходов.

Цель работы – сравнение жизнеспособности бактерий в жидкой среде и в составе биопленок при воздействии биоцидных веществ.

В работе использовали чистые культуры микроорганизмов *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Суточные культуры бактерий разводили свежим питательным бульоном в 4 раза и выращивали при 37°C с аэрацией в течение 2 ч, после чего методом посева разведений на чашки с агаризованной питательной средой подсчитывали начальную концентрацию клеток.

Для учета растущих и метаболизирующих форм микроорганизмов использовали оптико-редуктазный метод анализа, описанный нами ранее [4].

Биопленки получали на обезжиренных покровных стеклах, помещенных в чашки Петри, а также в 96-луночном пластиковом планшете. В лунки планшета вносили по $0,4 \text{ см}^3$ физиологического раствора и $0,1 \text{ см}^3$ суточной бульонной культуры микроорганизмов ($5 \cdot 10^7 \text{ кл./см}^3$). Для покровных стекол объемы сред увеличивали в 20 раз при тех же соотношениях компонентов. Образцы инкубировали в термостате при 37°C в течение 3 сут, добавляя каждый день свежий ПБ.

Формирование биопленок на покровных стеклах наблюдали с помощью светового микроскопа «Биолам-2М», для чего стекла извлекали из чашки Петри на разных стадиях культивирования клеток, промывали физиологическим раствором или дистиллированной водой, фиксировали 95%-ным спиртом и окрашивали раствором генцианового фиолетового (ГФ). Содержание клеток в биопленке определяли по оптической плотности красителя генцианового фиолетового, связанного с клетками. Измерения проводили на длине волны 570 нм с помощью спектрофотометра СФ-16.

Жизнеспособность микроорганизмов оценивали по их ростовой и редуцтазной активности. Удельную скорость роста популяции микроорганизмов в питательном бульоне (ПБ), а также в присутствии биоцидных веществ определяли по изменению оптической плотности среды на длине волны 730 нм .

Редуцтазную активность клеток в контрольных пробах и в присутствии биоцидов оценивали методом редуцтазной пробы с $0,001\%$ -ным метиленовым синим (МС), измеряя скорость восстановления окисленной формы редокс-красителя на длине волны 660 нм .

Анализ ростовой и биохимической активности микроорганизмов проводили в планшетах, содержащих одинаковое количество клеток (10^7 кл./мл), но разные концентрации антисептиков. Образцы выдерживали в термостате при 37°C и периодически отбирали пробы для измерения оптической плотности на длинах волн 660 и 730 нм .

Влияние биоцидных веществ на биопленки микроорганизмов определяли по изменению времени обесцвечивания МС. Для этого в ячейки планшета добавляли по $0,2 \text{ см}^3$ питательного бульона с МС, биоцидного вещества в концентрациях $0,001\text{--}0,1\%$ и культуру клеток в ПБ ($3 \cdot 10^7 \text{ кл./см}^3$). В контрольном образце вместо биоцида использовали $0,2 \text{ см}^3$ физиологического раствора.

В качестве антисептиков применяли препарат полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ), хлоргексидин биглюконат (ХГ), антибиотик ампициллин.

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

На первом этапе исследования было изучено влияние антисептиков на ростовую и биохимическую активность клеток в жидкой питательной среде. Использование предложенного нами оптико-редуктазного метода анализа на двух длинах волн [4] позволило одновременно следить за изменением ростовой и метаболической активности клеток в присутствии биоцидного вещества (рис. 1, 2).

На рис. 1 приведена кинетика изменения оптической плотности D_{730} , характеризующая ростовую активность клеток *B. subtilis* в ПБ, в зависимости от концентрации ПГМГ. Изучение влияния концентрации ПГМГ на светорассеивание клеток *B. subtilis* показало (рис. 1), что $0,001\%$ ПГМГ уменьшал ростовую активность клеток на 30% по сравнению с контрольным образцом. Увеличение концентрации ПГМГ до $0,003\%$ приводило к дальнейшему падению ростовой и биохимической активности клеток. Сравнительный анализ изменений светорассеяния и редуцтазной активности клеток *B. subtilis* (рис. 1, 2) в присутствии биоцида ПГМГ свидетельствует о том, что микроорганизмы раньше теряют способность к размножению, чем лишаются окислительно-восстановительной активности. Это может указывать на то, что часть клеток микроорганизмов находится в некультивируемой, но метаболизирующей форме.

При увеличении концентрации биоцида наблюдался также быстрый рост светорассеивания среды, в то время как скорость размножения и метаболическая активность клеток уменьшались (рис. 1, 2). Данный результат указывает на то, что в процессе адаптации микроорганизмов к ПГМГ протекают процессы ассоциации клеток.

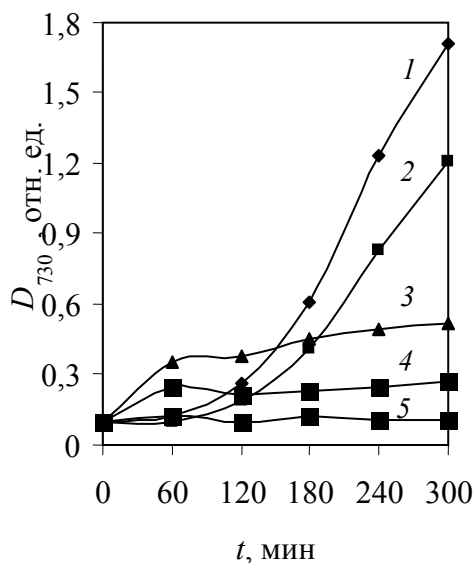


Рис. 1. Кинетика изменения оптической плотности D_{730} клеток *B. subtilis* от времени их культивирования в ПБ с ПГМГ, %: 1 – 0; 2 – 0,001; 3 – 0,003; 4 – 0,009; 5 – 0,012

Это может рассматриваться как один из механизмов повышения устойчивости микроорганизмов в присутствии биоцидов.

Дальнейшее увеличение концентрации ПГМГ до 0,009% приводило к уменьшению светорассеяния ассоциированных форм, по-видимому, в результате агрегации и осаждения клеток. Бактерии *B. subtilis* теряли способность размножаться, сохраняя редуцтазную активность (рис. 2).

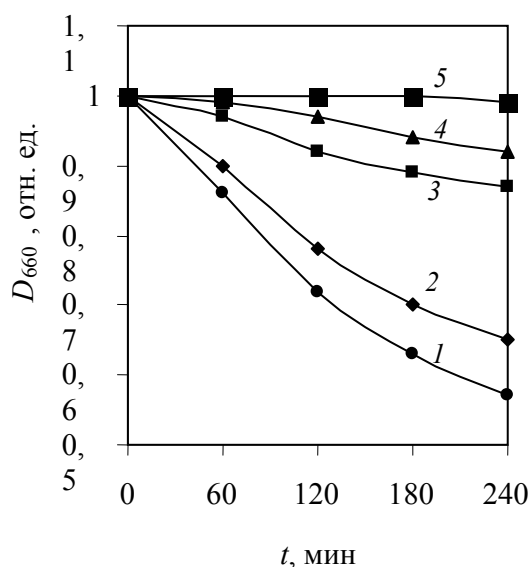


Рис. 2. Изменение оптической плотности D_{660} от времени культивирования клеток *B. subtilis* в ПБ с ПГМГ, %: 1 – 0; 2 – 0,001; 3 – 0,003; 4 – 0,009; 5 – 0,012

Это может указывать на то, что объединение клеток носит активный характер и связано с жизнеспособными микроорганизмами. Процессы ассоциации клеток можно рассматривать как начальный этап образования биопленок в жидкой фазе.

При концентрациях ПГМГ выше 0,01% редуцтазная и ростовая активность микроорганизмов подавлялись и клетки теряли жизнеспособность (рис. 1, 2 (5)).

На втором этапе исследования было изучено влияние биоцидов на бактерии в составе биопленок. На рис. 3, 4 приведены зависимости относительного времени обесцвечивания красителя МС (t_0) бактериями от длительности культивирования клеток в присутствии биоцидов. Величину t_0 определяли, как

$$t_0 = \tau / \tau_i,$$

где τ – текущее время обесцвечивания МС клетками; τ_i – время восстановления МС суточной культурой ($i = 1$).

Приведенные зависимости отражают изменение редуцтазной активности клеток в процессе формирования биопленки. Как следует из

рис. 3, в контрольной биопленке время обесцвечивания МС на третьи сутки уменьшилось в 2 раза по сравнению с первыми сутками. Это может быть связано с ростом количества микроорганизмов с течением времени. Об этом также свидетельствует увеличение на 40% оптической плотности связанного с клетками красителя ГФ в параллельных экспериментах.

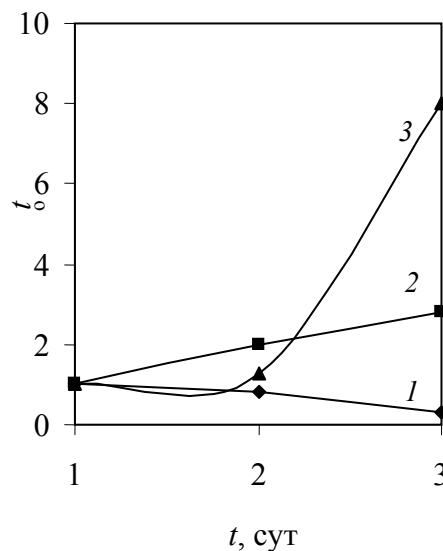


Рис. 3. Изменение относительного времени обесцвечивания красителя МС бактериями *E. coli* при формировании биопленок в присутствии биоцидов: 1 – контроль; 2 – хлоргексидин (0,01%); 3 – ампициллин (0,001%)

Известно, что процесс образования биопленок протекает в несколько этапов [1]. На первой стадии формируется слой адсорбированных молекул на твердой поверхности. На второй и третьей стадиях наблюдаются процессы обратимой и необратимой адгезии микроорганизмов к поверхности. Данные процессы реализуются в первые часы и сутки образования биопленки. Позже они сменяются стадией размножения клеток и формирования внутренней структуры биопленки.

В присутствии биоцидных веществ рост биопленок замедляется, о чем свидетельствует снижение оптической плотности связанного красителя ГФ и увеличение времени обесцвечивания МС в 3–8 раз по сравнению с контрольным образцом биопленки. Скорость образования биопленок зависела от вида и концентрации антисептика. Наибольшую активность против *E. coli* проявлял ампициллин.

На рис. 4 приведен сравнительный анализ изменения величины t_0 для *B. subtilis* в ПБ и в биопленке в присутствии ПГМГ от длительности культивирования клеток.

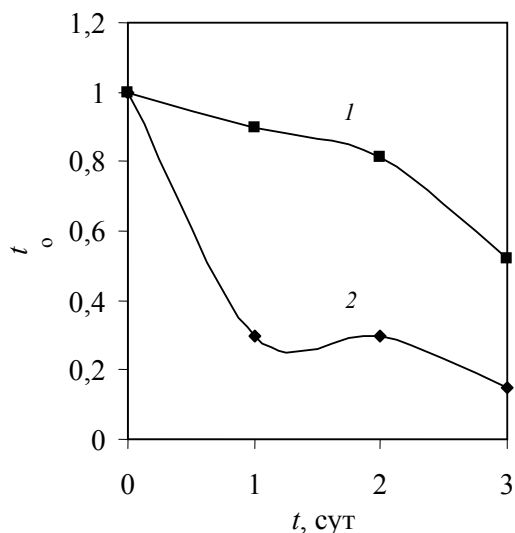


Рис. 4. Изменение относительного времени обесцвечивания красителя МС бактериями *B. subtilis* в ПБ и био пленке в присутствии 0,003% ПГМГ: 1 – ПБ; 2 – био пленка

Как видно из рис. 4 (1), активность *B. subtilis* в ПБ в присутствии ПГМГ медленно увеличивается в течение 2 сут по сравнению с начальным моментом времени. Это, видимо, связано с продолжающимся процессом размножения устойчивых форм клеток в присутствии биоцида. После 2 сут культивирования клеток наблюдалось более быстрое увеличение их редуцтазной активности, что может быть связано с адаптацией микроорганизмов к анти-септику.

Редуцтазная активность бактерий в составе 3-суточной био пленки (рис. 4 (2)) в присутствии ПГМГ была на порядок выше, чем у клеток в ПБ в начальный момент времени. Это указывает на повышение устойчивости микроорганизмов к биоциду в иммобилизованном состоянии. Изменение редуцтазной активности бактерий *B. subtilis* в био пленке в присутствии ПГМГ носило нелинейный характер, что может быть обусловлено изменением активности самих клеток в структуре био пленки. В частно-

сти, указывается на существование клеточных кластеров с разной ростовой активностью – стайеров, спринтеров, микстов [5].

Заключение. В результате проведенной работы установлено, что при действии биоцидов ростовая и редуцтазная активности клеток изменяются независимо. Проявление редуцтазной активности в отсутствие роста клеток указывает на присутствие некультивируемых, но метаболизующих клеток. При умеренных концентрациях биоцидов протекают процессы ассоциации бактерий, которые могут рассматриваться как один из механизмов адаптации клеток и повышения их устойчивости к биоцидам.

Редуцтазный метод анализа позволяет изучать биохимическую активность клеток, как в водной среде, так и в составе био пленок. В присутствии биоцидных веществ редуцтазная активность микроорганизмов и скорость образования био пленок уменьшаются и зависят от типа биоцида и его концентрации. Биоцидная устойчивость бактерий в составе био пленок на порядок выше, чем для клеток в жидкой среде.

Литература

1. Био пленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма (обзор) / Ю. А. Николаев [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 2. – С. 149–163.
2. Юрин, В. М. Иммобилизованные клетки и ферменты: курс лекций / В. М. Юрин. – Минск: БГУ, 2006. – 133 с.
3. Тец, В. В. Эффективность действия антибиотиков на бактерии в био пленках / В. В. Тец, Н. В. Заславская // Микробиологический журнал. – 2005. – № 5. – С. 24–26.
4. Михейчик, Н. М. Анализ влияния ксенобиотиков на ростовую и биохимическую активность клеток бактерий / Н. М. Михейчик, А. В. Игнатенко // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в. – 2007. – Вып. XV. – С. 216–220.
5. Олескин, А. В. Сетевая структура в микробиологии / А. В. Олескин, Т. А. Кировская // Вестник РАН. – 2007. – Т. 77, № 2. – С. 139–148.