

Maturation // The Scientific World Journal. – 2013. – Article ID 846796. – 13 p.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/846796>

Marinescu M.T., Kolesnikova L.S., Gavyuk L.A., Bezhan N.A. Dynamics of anatomo-cytological and biochemical characteristics of pear fruit in storage // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2017. – Vol. 144. – Part II. – P. 148-152.

Some structural-anatomical and biochemical indicators characterized changes in pear fruits during long-term storage are investigated. The positive effect of the ethylene inhibitor Phytomag on the dynamics of fruit maturation processes was revealed.

Key words: *pear; fruit; storage; storability; ethylene inhibitor; anatomical structure; biochemical characteristics; starch; carbohydrates.*

УДК 579.64

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ: СТРУКТУРА, ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

**Мария Александровна Погорелова¹, Александр Львович Кузнецов¹,
Олег Александрович Суворов¹, Лариса Григорьевна Ипатова¹,
Александр Григорьевич Погорелов¹**

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская 3, ИТЭБ РАН
agpogorelov@rambler.ru

Цель данной работы заключалась в том, чтобы исследовать популяцию клеток в биопленке, сформированной на пористой поверхности, а также изучить возможность ее удаления посредством электрохимически активированного водного раствора. Исследование проводили на лабораторном стенде в виде рециркуляционной системы, заполненной средой культивирования с микрофлорой (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermani*). Структуру сформированной биопленки изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Анализ полученных микрофотографий показал, что катодит, электрохимически активированный водный раствор обеспечивает дезинтеграцию биопленки.

Ключевые слова: *биопленка, сканирующая электронная микроскопия, катодит*

Введение

Биопленка формируется на границе между твердой поверхностью и влажной средой, образуя сообщество, как правило, нескольких видов микроорганизмов [1]. В процессе роста у биопленки появляется устойчивость к дезинфекции [2]. О причинах резистентности можно догадываться, но сложная пространственная организация биопленки и разнообразие заселяющих ее видов делают возможным выживаемость микроорганизмов в экстремальных условиях. Многоклеточный слой биопленки включает в себя бактерии, простейшие одноклеточные, грибы, которые кооперируются в симбиоз. Важной структурной компонентой такой микробиологической колонии является внеклеточный матрикс [3], в состав которого входят в основном полисахариды, а также белки, протеоглики, гликолипиды. Основная функция матрикса заключается в том, чтобы регулировать внутренний гомеостаз биопленки [4].

Биопленка представляет собой источник бактериального и химического заражения плодовой продукции, является причиной сокращения сроков ее хранения и снижения качества. Поэтому актуальной является разработка принципиально новых

способов удаления биопленки, которые были бы не только эффективными, но и одновременно безопасными для экологии. Сформулированная проблема решается посредством применения электрохимически активированных водных растворов [5-6], которые обладают широким спектром бактерицидного действия и, со временем, трансформируются в обыкновенную воду. Сличительная экспертиза разрабатываемых подходов обеззараживания биопленки требует использования специализированных станций [7-8]. В данном исследовании решали общую задачу разработки принципов и протокола формирования биопленки в контролируемых условиях, а также методов ее визуализации посредством электронной микроскопии. Развитие данного направления позволит изучать дезинтеграцию биопленки, моделируя ее рост в разных ситуациях, в том числе на поверхности плодово-ягодной и орехоплодной продукции.

Объект и методы исследования

Биопленку формировали в рециркуляционной проточной системе, принципы которой нами опубликованы ранее [9]. Для электронной микроскопии препараты готовили посредством известной методики [10]. Образец трубки длиной около 10 мм разрезали на две части по направляющей линии, которые для фиксации биопленки помещали на 12 часов в 1,5% раствор глутарового альдегида при 4°C. На следующем этапе постфиксацию проводили в 1% водном растворе тетраоксида осмия (OsO_4) при комнатной температуре в течение 12 часов. Затем препарат дегидратировали в трех водных растворах этилового спирта возрастающей концентрации (50%, 75%, 98%). Удаления этанола проводили в гексаметилдисилазан (HMDS), после чего высушивали на воздухе. Подготовленные образцы монтировали на объектодержатель электронного микроскопа посредством токопроводящего клея. Перед просмотром, в установке JFC 1600 (JEOL, Япония) на поверхность препарата наносили равномерную токопроводящую пленку платины толщиной 20 нм посредством ионного распыления металла в среде аргоновой плазмы. Ультраструктуру рельефа биопленки изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ, используя режим вторичных электронов.

Результаты и обсуждение

Для иллюстрации на рисунках 1 и 2 приведены микрофотографии биопленки, сформированной на поверхности внутренней стенке трубки рециркуляционной системы лабораторного стенда бифидобактериями. Изначально планктонная форма микроорганизмов находилась в потоке питательной среды.

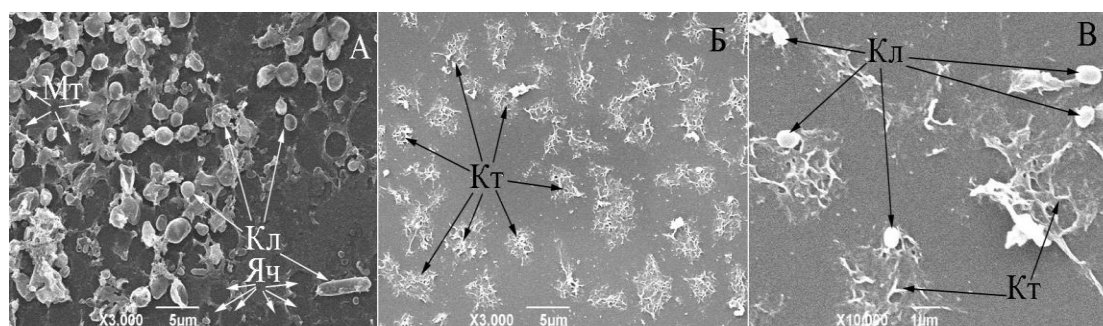


Рис. 1 Сканирующая электронная микроскопия биопленки бифидобактерий, сформированной на поверхности внутренней стенки рециркуляционной трубки лабораторного стенда

Примечание: А – поверхность, покрытая зрелой биопленкой, Б – фрагменты биопленки после 15 минут очистки поверхности катодом, В – тот же участок поверхности при большем увеличении.

Обозначения: Кл – клетка, Мт – матрикс зрелой биопленки, Яч – место отторжений клетки от матрикса, Кт – кластеры деградированного матрикса после очистки поверхности.

Уровень дезинтеграции биопленки зависит от качества обработки поверхности. Видно, что в тело зрелой биопленки встроены отдельные клетки (рис.1А). В матриксе идентифицируются пустые ячейки, которые образуются в результате отслоения бактерий при выделении вторичной планктонной формы для колонизации других участков. Изображение после кратковременной (15 минут) очистки поверхности католитом показано на микрофотографии 1Б. В результате обработки рециркуляционной системы посредством электрохимически редуцированной воды произошла дезинтеграция пленки. Однако остались фрагменты деградированного матрикса, которые не визуализируются посредством оптической микроскопии. На рисунке 1В показан тот же участок поверхности при большем увеличении, где видны одиночные клетки, встроенные в кластеры матрикса, которые могут быть причиной быстрой регенерации биопленки.

Рисунок 2 демонстрирует качество удаления биопленки, сформированной бифидобактериями, после ее удаления с поверхности разными моющими веществами.

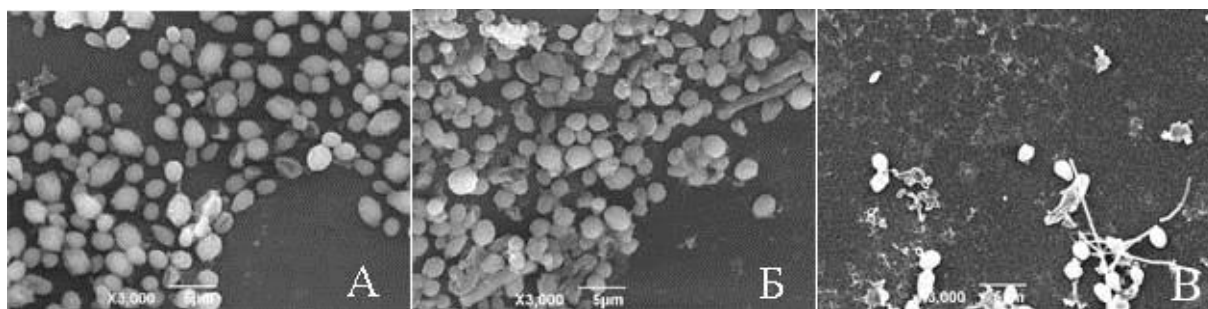


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия биопленки бифидобактерий, сформированной на поверхности внутренней стенки рециркуляционной трубки лабораторного стенда

Примечание: А – поверхность, покрытая зрелой биопленкой, Б – результат дезинфекции 10% водным раствором гидроксида натрия (NaOH), В – результат дезинфекции 10% католитом.

Визуальное сравнение показывает, что дезинфекция 10% водным раствором гидроксида натрия практически не влияет на степень очистки поверхности (рис.1А и рис.1Б). Качественное изменение структуры биопленки наблюдается после обработки католитом (рис.1В). Таким образом, электрохимически редуцированная фракция воды действительно приводит к очистке поверхности рециркуляционной системы стенда посредством удаления биопленки. В завершение обсуждения результатов отметим следующее. Дальнейшие лабораторные исследования оптимизации протокола дадут значимый эффект в нескольких важных агропромышленных технологиях. В их ряду выделим: (i) открытая поверхность разного рельефа сложности – модель плодово-ягодной и орехоплодной продукции, (ii) внутренняя поверхность пористого материала – модель гидропонного покрытия в тепличном производстве, (iii) транспорт жидкости в системе с застойными зонами – модель трубопровода сложной конфигурации. *Исследование поддержано Российским научным фондом, проект № 17-76-20014.*

Список литературы

1. Rollet C., Gal L., Guzzo J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* // FEMS Microbiol. Lett. – 2009. - Vol. 290. – P. 135 – 142.
2. Bridier A., Briandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review // Biofouling. – 2014. – Vol. 27. – P. 1017 – 1032.
3. Kumar M.A., Anandapandian K.T.K., Parthiban K. Production and Characterization of Exopolysaccharides (EPS) from Biofilm Forming Marine Bacterium // Braz. Arch. Biol. Technol. – 2011. Vol. 54. – P. 259 – 265.
4. Wilking J.N., Angelini T.E., Seminara A., Brenner M.P., Weitz D.A. Biofilms as complex fluids // MRS Bulletin. – 2011. – Vol. 36. – P. 385–391.
5. D'Atanasio N., Capezzone de Joannon A., Mangano G., Meloni M., Giarratana N., Milanese C., Tongiani S. A New Acid-oxidizing Solution: Assessment of Its Role on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm Morphological Changes // Wounds. – 2015. – Vol. 27. – P. 265 – 273.
6. Cloete T.E., Thantsha M.S., Maluleke M.R., Kirkpatrick R. The antimicrobial mechanism of electrochemically activated water against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as determined by SDS-PAGE analysis // J Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 107. – P. 379 – 384.
7. Crusz S.A., Popat R., Rybtko M.T., Cámara M., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Diggle S.P., Williams P. Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology // Biofouling. – 2012. – Vol. 28. – P. 835 – 842.
8. Ludecke C., Jandt K.D., Siegismund D., Kujau M.J., Zang E., Rettenmayr M., Bossert J., Roth M. Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9. – P. e84837 – e84837.
9. Pogorelov A.G., Bakhir V.M., Ipatova L.G., Kuznetsov A.L., Suvorov O.A., Kozlov I.V. Modeling, formation, destruction and scanning electron microscopy of biofilms // Int. J. of Pharmaceutical Res. & Allied Sciences. – 2017. – Vol. 6. – P. 145 – 152.
10. Pogorelov A.G., Chebotar I.V., Pogorelova V.N. Scanning electron microscopy of biofilms adherent to the inner catheter surface // Bul. Exp. Biol. Med. – 2014. – Vol. 157. – P. 711 – 713.

Pogorelova M.A., Kuznetsov A.L., Suvorov O.A., Ipatova L.G., Pogorelov A.G. Experimental modeling of biofilm: structure, destruction and imaging // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2017. – Vol. 144. – Part II. – P. 152-155.

This work was aimed to study the cellular population of a biofilm formed on porous surface, as well as to investigate a method for its destruction using electrochemically activated solutions. The study was carried out on an experimental stand in the form of a water recirculation system with the possibility for infecting microflora to cultivate the biofilms. As a starting culture, a dried mixture of microorganisms (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermani*) was applied. The biofilm formation was examined with electron scanning microscopy. Then, the approaches to destroy the bacterial biofilms were studied using electrochemically activated solutions. The analysis of microphotographs showed that electrochemically activated water allows a damaging effect on bacterial biofilm. This work was supported by the Russian Science Foundation grant 17-76-20014.

Key words: *biofilm; scanning electron microscopy; electrochemically reduced water.*