

УДК 576.8:620.193

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА БИОПЛЕНКИ КОРРОЗИОННО-АКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ

М. А. Борецкая¹
О. С. Сулова²
В. Ф. Горчев³
С. А. Карахим³

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев
²УНЦ «Институт биологии» КНУ имени Тараса Шевченко, Киев
³Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: mashapro@ukr.net

Получено 15.03.2012

Изучены углеводные и протеиновые компоненты биопленки, сформированной на поверхности малоуглеродистой стали коррозионно-активными бактериями *Thiobacillus thioarvus* 224М и гетеротрофным спутником *Stenotrophomonas maltophilia* 22М. Установлено, что при совместном культивировании в составе экзополимера появляются моносахариды, ранее не встречающиеся в составе матрикса монокультур (рамноза, рибоза, ксилоза, галактоза). С помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) изучена пространственная локализация компонентов матрикса биопленки. Использование флуоресцентно-меченого лектина Concanavalin A (Sigma, США) и протеинспецифичного красителя Thiazine Red (Sigma, США) позволило показать структурные особенности биопленки, связанные с пространственной локализацией компонентов. Полученные данные об изучении структуры и функций биопленок важны для понимания механизмов образования таких форм в природе, медицине, промышленности.

Ключевые слова: биопленка, экзополимерный комплекс, флуоресценция, бактерии цикла серы.

Создание новых методов защиты поверхности металлов, основанных на принципах современной биотехнологии, требует изучения пространственной структуры биопленок и ее организации. Известно, что основой биопленок является экзополимерный комплекс (ЭПК), синтезируемый микроорганизмами на твердой поверхности в процессе роста. Состав ЭПК биопленки во многом зависит от сообщества микроорганизмов, состава питательной среды, присутствия и качества субстрата [1, 2]. Такие соединения, как полисахариды, липиды, гликолипиды, гликопротеины и экстрацеллюлярные ДНК, выполняют в биопленке структурную и функциональную роль [3].

Многочисленные исследования ЭПК биопленок сфокусированы в основном на изучении роли полисахаридов как основных компонентов матрикса. На присутствие и возможное участие в построении биопленок других макромолекул внимание зачастую не обращается. Тем не менее, в ряде работ отмечается второстепенная роль альгинатов в случае формирования биопленки *Pseudomonas aeruginosa* [4] и показана важ-

ность внеклеточного протеина у *E. coli*, отвечающего за адгезию к субстрату [5]. Поэтому нельзя однозначно утверждать, что только углеводы в составе ЭПК играют основную роль в формировании структуры и механизмов функционирования биопленки.

В настоящее время для изучения физико-химических свойств биопленок широко применяют такие методы исследования, как флуоресцентная, атомно-силовая, лазерная двухфотонная и Раман-микроскопия. Однако наибольшее распространение получила лазерная конфокальная сканирующая микроскопия. Одним из ее преимуществ является исследование нативного образца, что дает возможность наблюдать естественную, гидратированную архитектуру биопленок, а также получать трехмерное изображение биопленки посредством сканирования по оси Z.

Исследование структуры и свойств биопленок представляет интерес не только для фундаментальной науки, но и имеет большое прикладное значение. Так, изучение состава ЭПК биопленок, сформированных на поверхности подземных металлических конструкций необходимо для создания

новых биотехнологий их защиты от микробной коррозии.

К сообществу коррозионно-активных микроорганизмов относят сульфатовосстанавливающие бактерии рода *Desulfovibrio*, тионовые бактерии рода *Thiobacillus* и их гетеротрофные спутники. Микробная коррозия является одним из наиболее опасных видов коррозии, разрушающей трубопроводы, топливные цистерны, металлические подземные сооружения и т. д. [6, 7]. Участие бактерий цикла серы в процессе коррозии подземных сооружений было показано еще в 1930-е гг. Kuhr и Vlugt [8], которые отметили, что коррозия газопровода была вызвана активным развитием сульфатовосстанавливающих бактерий. Биопленка, как зона непосредственного контакта клеток с металлом, получила название «ферросфера» [9].

Ранее нами было показано, что *Stenotrophomonas maltophilia* является неотъемлемым компонентом коррозионно-активного сообщества и природным ассоциантом ацидофобных тионовых бактерий *Thiobacillus thioeparus* [10]. Биопленка, сформированная ассоциацией *S. maltophilia* и *T. thioeparus* на поверхности малоуглеродистой стали, более гетерогенна, скорость коррозии значительно выше по сравнению с монокультурой *T. thioeparus*.

Структура биопленки, сформированной на поверхности малоуглеродистой стали ацидофобными тионовыми бактериями *T. thioeparus* и их гетеротрофным спутником *S. maltophilia*, существенно зависела от присутствия в среде металла и ассоциативного комплекса бактерий [10].

Целью данной работы было исследование состава и структурных особенностей биопленки тионовых ацидофобных бактерий и их ассоциаций с гетеротрофным компонентом на поверхности малоуглеродистой стали.

Материалы и методы

Выделение ацидофобных тионовых бактерий *T. thioeparus* и *S. maltophilia*

Бактерии были выделены из грунтовых вод и почвенных отложений тоннелей Киевского метрополитена (ст. «Тараса Шевченко» — «Контрактовая площадь») на уровне палеогена и неогена методом культивирования на среде Бейеринка [11]. Состав стальной пластины и метод подготовки пластины как поверхности для формирования биопленки описаны в литературе [10].

Определение моносахаридного состава экзополимерного комплекса биопленки *T. thioeparus* 224М и *S. maltophilia* 22М

Монокультуры *T. thioeparus* 224М, *S. maltophilia* 22М и их ассоциацию культивировали на жидкой среде Бейеринка в течение 4 сут при температуре 28 °С в присутствии обработанного стального образца 0,8 КП. Далее металлические образцы извлекали и отмывали от планктонных клеток стерильной водопроводной водой. С помощью ультразвуковой установки УЗДН-2Т (Россия) клетки биопленки, прикрепленные к металлу, отбивали в физиологический раствор 30 с по 3–5 подходов при 22 кГц. Клетки планктона отбирали из культуральной жидкости. Для отделения экзополимера от клеток клеточную суспензию обрабатывали при помощи магнитной мешалки около 40 мин, после чего центрифугировали 30 мин при 3 000–5 000 g, 5 °С. Полученный супернатант концентрировали и осаждали ацетоном (1:3), как указано в литературе [12]. Осадок лиофильно высушивали.

Анализ моносахаридного состава экзополимеров биопленки

Образцы для определения моносахаридного состава готовили методом Albersheim [13]. Анализ моносахаридного состава проводили хромато-масс-спектрометрическим методом (Agilent 6890N/5973 inert, колонка капиллярная DB MS 30 м×0,25 мм×0,25 мкм, температурный режим изократический, 220 °С, газ носитель — гелий, скорость потока — 1 мл/мин, температура испарения 250 °С).

Подготовка к окрашиванию флуорохромами и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Монокультуры *T. thioeparus* 224М, *S. maltophilia* 22М и их ассоциацию культивировали в жидкой среде Бейеринка [14] в присутствии образца малоуглеродистой стали 0,8 КП при температуре 28 °С. Стальные пластины с биопленкой извлекали из культуральной жидкости на 4-е и 7-е сутки и промывали в физиологическом растворе 3–5 раз с целью снятия клеток планктона. Фиксировали клетки биопленки на металле в парах 40% -го раствора формальдегида около 20 мин.

Для визуализации углеводного состава экзополимера применяли лектин Con-A, меченый флуоресцентным красителем FITC (Lectin Fluorescein isothiocyanate conjugate from *Canavalia ensiformis*, Sigma, США). Для визуализации нуклеинсодержащих компонентов экзополимера — DAPI (4',6'-

Diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid, Sigma, США), протеинсодержащих компонентов — Thiazine Red (Thiazine Red, Sigma, США). Пространственное распределение этих компонентов в экзополимере исследовали на лазерном сканирующем конфокальном LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Исследования проводили в режиме Multi Track. Возбуждение флуоресценции FITC осуществляли на длине волны 488 нм, а ее регистрацию — в диапазоне от 505 нм и выше (светофильтр LP 505). Флуоресценцию DAPI возбуждали с помощью лазера на длине волны 405 нм, а для регистрации сигнала использовали светофильтр BP 420–480. Для возбуждения флуоресценции Thiazine Red применяли лазер с длиной волны 514 нм, регистрировали в диапазоне 560–615 нм (светофильтр BP 560–615). Изучение пространственного распределения исследуемых компонентов в экзополимере осуществляли в режиме Z-Stack, а для получения трехмерно изображения использовали функцию 3D.

Все исследования проводили троекратно.

Результаты и обсуждение

Были рассмотрены биопленки, сформированные монокультурами *T. thioparus* 224M и *S. maltophilia* 22M, их ассоциацией на поверхности малоуглеродистой стали 08КП на 4-е и 7-е сут культивирования.

Моносахаридный состав экзополимерного матрикса

Исследование моносахаридов экзополимера биопленки, сформированной на 4-е сут, показало, что его состав был качественно идентичен для монокультур *T. thioparus* 224M, *S. maltophilia* 22M и содержал фукозу, арабинозу, маннозу и глюкозу (рис. 1). Количество последней было доминирующим и составляло 88,3 и 46,1% от общей суммы площадей пиков соответственно для каждой из монокультур. Матрикс ассоциативной культуры, кроме вышеуказанных моносахаров в экзополимере биопленки монокультур, содержал также рамнозу, рибозу, ксилозу, галактозу.

Таким образом, присутствие двух ассоциативных культур в биопленке привело к синтезу моносахаридов, которые не определялись в составе экзополимера каждой из монокультур. Возможно, именно это обуславливает увеличение коррозионной активности, способствует формированию сложной гетерогенной структуры биопленки, которое было описано нами ранее [10].

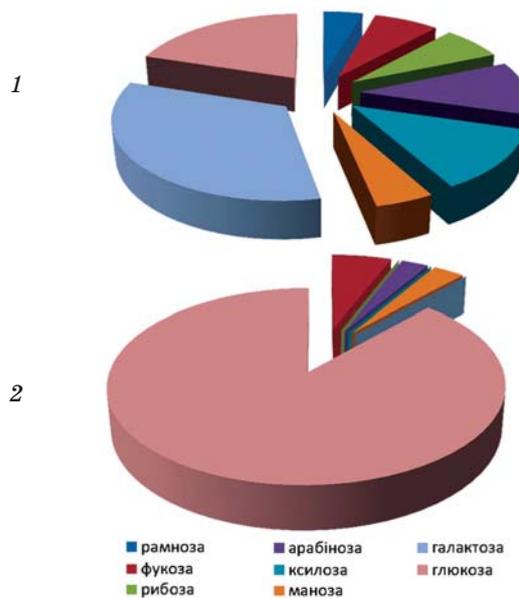


Рис. 1. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса биопленки: ассоциированной культуры (1) и монокультуры *Thiobacillus thioparus* 224M (2)

Визуализация углеводов и нуклеиновых кислот в экзополимерном матриксе биопленки

Одним из доминирующих моносахаридов как для монокультур, так и для их ассоциации была глюкоза, в связи с чем для визуализации углеводного состава матрикса биопленки мы применяли глюкозоспецифичный лектин Con-A.

На 4-е сут культивирования клетки моно- и ассоциированной культуры сформировали биопленку (рис. 2).

Структура, сформированная ассоциацией бактерий, была более агрегированной. Это коррелирует с данными о богатом моносахаридном составе экзополимера бинарной биопленки относительно монокультур. Согласно предыдущим данным, структура, образованная на поверхности малоуглеродистой стали ассоциированной культурой, была более стойкой к разрушению, скорость коррозии под воздействием такой биопленки почти в 5 раз выше по сравнению с влиянием монокультуры, удельная продукция экзополимера также была выше почти в 3 раза [15].

Толщина углеводсодержащего слоя в комплексе с нуклеинсодержащими компонентами биопленки, сформированной ассоциацией, составляла в среднем 120 мкм, в то время как аналогичная толщина для монокультуры *T. thioparus* 224M была почти в 2 раза меньше (в среднем 70 мкм), а для монокультуры *S. maltophilia* 22M — в 1,5 раза (в среднем 90 мкм).

На 7-е сут в биопленке как монокультур, так и ассоциации сохранялось соотношение

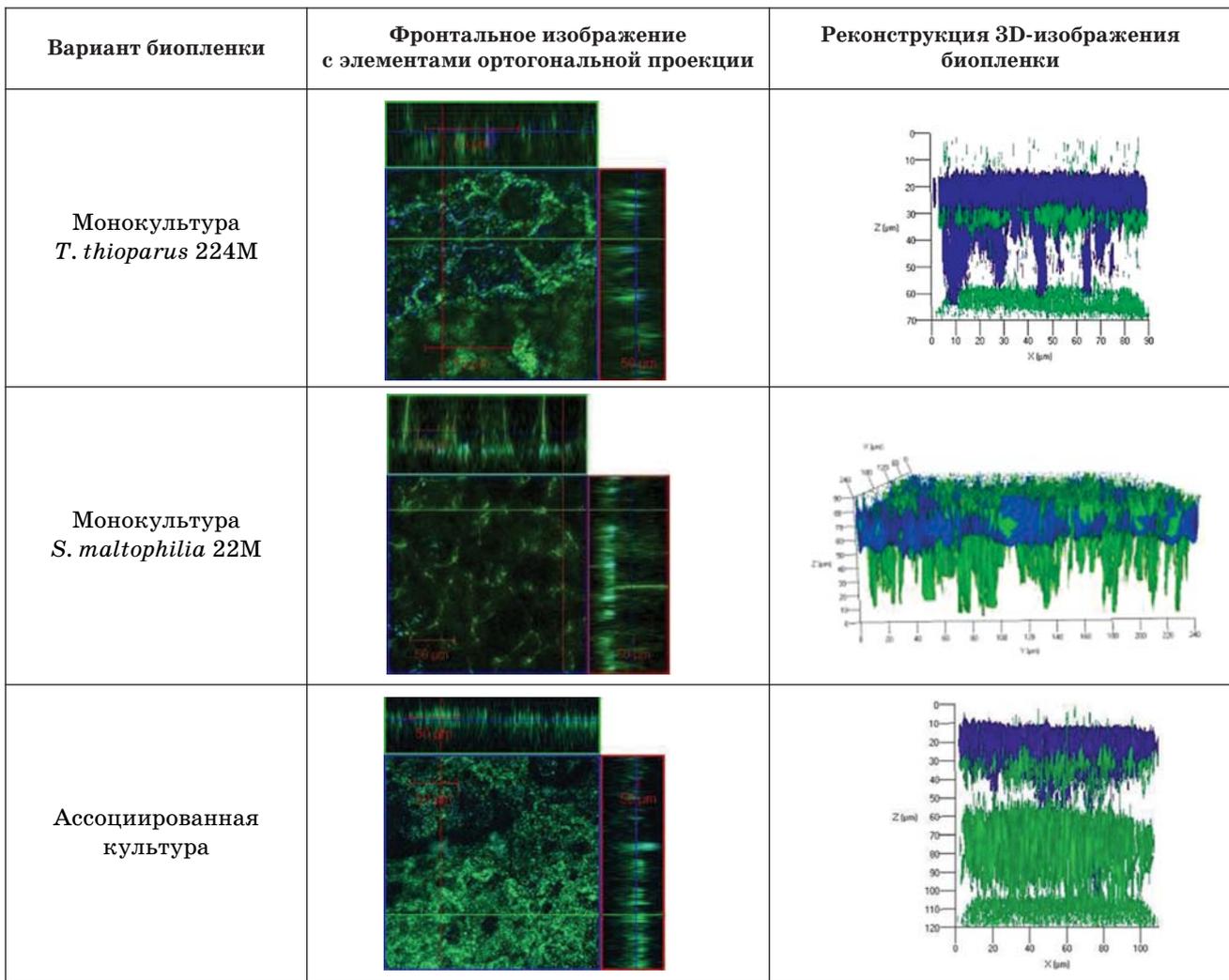


Рис. 2. Биопленка *Thiobacillus thioparus* 224M, *Stenotrophomonas maltophilia* 22M и их ассоциации, сформированная на поверхности малоуглеродистой стали на 4-е сут:

углеводный состав экзополимера окрашен ConA+FITC (зеленый цвет), нуклеинсодержащие компоненты DAPI (голубой цвет). Размер шкалы 50 μm . Здесь и далее: конфокальный лазерный сканирующий микроскоп

углеводов и нуклеинсодержащих комплексов. На этом этапе развития толщина целой структуры для всех вариантов стала тоньше относительно 4-суточной. Так, для биопленки ассоциированной культуры она составляла в среднем 90 μm , что меньше предыдущей в среднем на 30 μm . Биопленка была образована слоями углеводсодержащих структур как снизу, так и сверху нуклеинового комплекса. Формирование верхнего углеводсодержащего слоя над слоем клеток биопленки на 7-е сут, возможно, связано с возникновением стрессовых факторов, таких как подкисление питательной среды продуктами метаболизма ацидофильных тионовых бактерий (например, серная кислота). Подобный слой может защищать клетки биопленки от воздействия кислоты и предотвращать гибель всей структуры.

Следует обратить внимание на присутствие нескольких слоев в структуре матрикса биопленки. Так, нуклеинсодержащие компоненты в течение всего периода культивирования располагаются в верхней части структуры, на поверхности биопленки, тогда как углеводсодержащие — в нижней.

На 4-е и 7-е сут опыта было обнаружено, что матрикс монокультуры *T. thioparus* 224M и ассоциации пронизан нуклеинсодержащими тяжами, связывающими поверхность металла и верхний слой биопленки. Согласно Vilain et al. [16] матрикс биопленки состоит, в основном, из протеинов и нуклеиновых кислот, представленных экстрацеллюлярными ДНК, которые могут выполнять функцию адгезинов. Возможно,

клетки на поверхности структуры контактируют с культуральной жидкостью, что обеспечивает активный метаболизм и развитие биопленки, а также с поверхностью металла, что связано с освобождением электронов и функционированием коррозионно-активной биопленки в качестве анода.

Отмечена разница в содержании и расположении углеводов в матриксе: для ассоциации, по сравнению с монокультурой, характерно расположение не только вблизи поверхности металла и рядом с нуклеиновыми кислотами, но и в толще структуры. Количество углеводов в биопленке монокультуры *T. thioparus* 224М незначительно (в среднем 10 μm). Вероятно, структура состоит из других компонентов. Для монокультуры *S. maltophilia* 22М характерно большее количество углеводсодержащих компонентов (около 90 μm), занимающее почти всю структуру биопленки, и клетки погружены в этот полимерный слой.

Визуализация протеинсодержащих и нуклеинсодержащих компонентов биопленки

Как уже отмечалось ранее, протеин является важным компонентом в структуре биопленки. Нами было исследовано содержание протеина в матриксе моно- и ассоци-

рованных культур с помощью протеинспецифичного красителя Thiazine Red.

Установлено, что на 4-е сут содержание протеина в матриксе монокультур *T. thioparus* 224М и *S. maltophilia* 22М намного меньше, чем для их ассоциации, что коррелирует с нашими предыдущими данными, полученными методом Bradford [16].

Как показано на рис. 3, на 4-е сут культивирования, нуклеинсодержащие компоненты экзополимерного матрикса как монокультур, так и ассоциации встроены в слой протеинов. Толщина слоя протеина в матриксе биопленки ассоциации тионовых бактерий и гетеротрофного компонента в среднем на 10 μm больше по сравнению с монокультурой *T. thioparus* 224М. Для монокультуры *S. maltophilia* 22М протеинсодержащий слой составлял в среднем 15–20 μm , что являлось наименьшим показателем для всех исследуемых вариантов биопленки, сформированных на поверхности малоуглеродистой стали.

Очевидно, протеинсодержащими компонентами являются экзоэнзимы, которые продуцируются клетками биопленки, поскольку они расположены в непосредственной близости от клеток. Возможно, с увеличением видового разнообразия энзи-

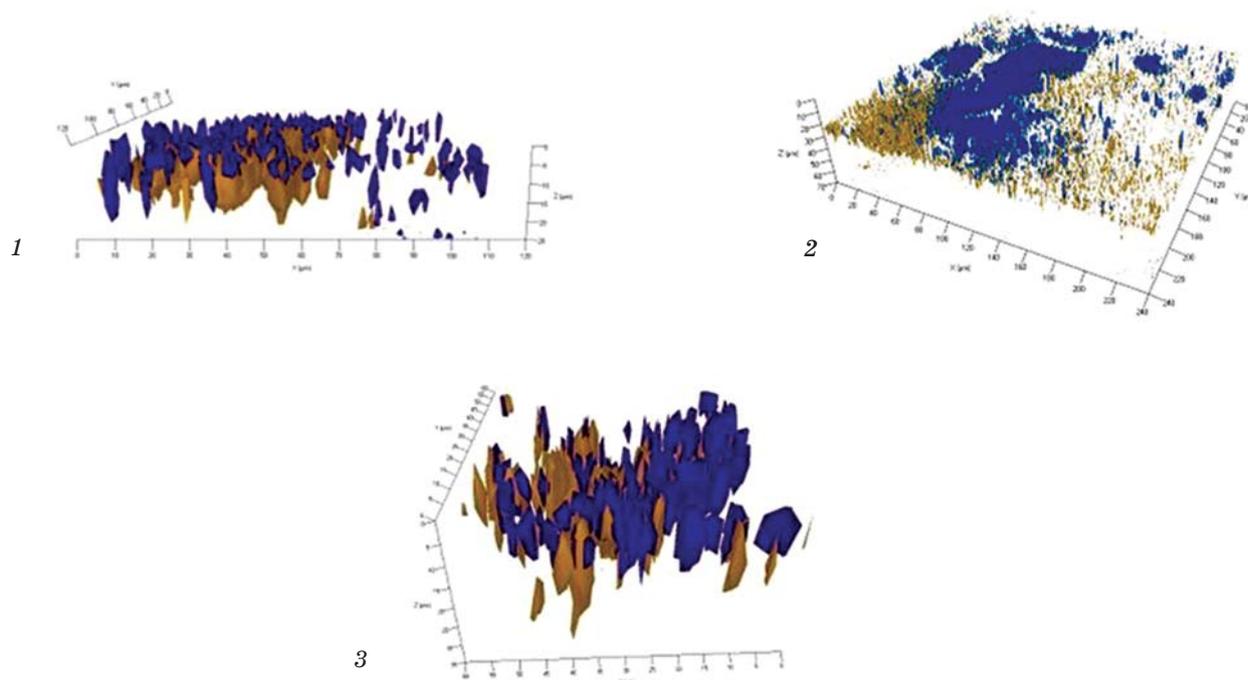


Рис. 3. Изображение, основанное свечением протеинсодержащих (Thiazine Red — оранжевый цвет) и нуклеинсодержащих (DAPI — голубой цвет) компонентов: в матриксе *Thiobacillus thioparus* 224М (1), *Stenotrophomonas maltophilia* 22М (2), ассоциативной культуры (3) на 4-е сут культивирования

матические системы функционируют активнее и способствуют увеличению коррозионной активности.

Исследование структуры биопленки бактерий цикла серы и их гетеротрофных спутников показало, что коррозионная активность коррелирует с данными не только о составе экзополимера, но и зависит от локализации компонентов в толще матрикса. Использование метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии позволило получить трехмерные модели углеводов-, протеин- и нуклеинсодержащих компонентов в структуре биопленки.

Установлено, что клетки расположены на поверхности биопленки и образуют тяжи в ее толще. Можно предположить, что подобная организация способствует связыванию поверхности биопленки, которая обеспечивает приток питательных веществ к клеткам из культуральной жидкости и отток метаболитов, а также функционирова-

ние биопленки как анода за счет не только биоминералов в толще матрикса (таких, как сера), но и непосредственного влияния бактерий, как описано в литературе [17]. Возможно, благодаря подобным взаимосвязям с металлом и реакциям кворум-сенсинга клетки контролируют свое присутствие на поверхности металла, действуя таким образом как скооперированное образование.

Таким образом, формирование биопленки является основным способом роста и размножения бактерий в жидкой среде. Благодаря этому клетки способны питаться, обмениваться генетической информацией и защищаться от неблагоприятных влияний окружающей среды. Изучение структуры и функций биопленки актуально для промышленности, медицины, понимания механизмов формирования биопленок в природе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wimpfen J. W. T., Colasanti R.* A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automation models // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 1999. — V. 22. — P. 1–16.
2. *Nadell C. D., Xavier J. B., Foster K. R.* The sociobiology of biofilms // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2009. — V. 33. — P. 206–224.
3. *Flemming H.-C., Neu T. R., Wozniak D. J.* The EPS matrix: The «House of biofilm cell» // *J. Bacteriol.* — 2007. — V. 189, N 22. — P. 7945–7947.
4. *Wozniak D. J., Wyckoff T. J. O., Starkey M. et al.* Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — V. 100. — P. 7907–7912.
5. *Lower B. H., Yongsuthon R., Vellano F. P., Lower S. K.* Simultaneous force and fluorescence measurements of protein that forms a bond between a living bacterium and solid surface // *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187, N 6. — P. 2127–2137.
6. *Андреюк Е. И., Козлова И. А.* Литотрофные бактерии и микробиологическая коррозия. — К.: Наук. думка, 1977. — 167 с.
7. *Baumgartner A. W.* Microbiological corrosion — what causes it and how it be controlled // *J. Petrol. Technol.* — 1962. — V. 14. — P. 1074–1078.
8. *Von Volzogen Kurh C. A. H., van der Vlugt L. S.* Grafication of iron as an electrobiological process in anaerobic soils // *Wat. Res.* — 1934. — V. 18. — P. 147–165.
9. *Андреюк Е. И., Пилященко-Новохатный А. И., Антоновская Н. С., Козлова И. А.* Ферросфера — зона формирования коррозионно-активного сообщества микроорганизмов // *Доп. НАН України.* — 2002. — № 3. — С. 157–161.
10. *Борецька М. О., Козлова І. П.* Вплив екзополімерів біоплівки на швидкість мікробної корозії маловуглецевої сталі // *Мікробіол. журн.* — 2007. — Т. 69, N 4. — С. 40–44.
11. *Протасова М. О., Собко В. М., Козлова І. П.* Адгезія і колонізація поверхні скла *Thiobacillus thioparus* та *Stenotrophomonas maltophilia* та їх бінарною культурою // *Там само.* — 2005. — Т. 67, № 6. — С. 57–63.
12. *Захарова І. Я., Косенко Л. В.* Методи изучения мікробних полісахаридов. — К.: Наук. думка, 1982. — 192 с.
13. *Albersheim P., Nevis D. J., English P. D., Karr A.* A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography // *Carbohydr. Res.* — 1967. — V. 5, N 3. — P. 340–345.
14. *Vishniak W.* The metabolism of *Thiocillus thioparus* // *J. Bacteriol.* — 1952. — N 64. — P. 363–372.
15. *Протасова М. О., Лазарев В. Г., Козлова І. П.* Дослідження структури біоплівок, сформованих бактеріями циклу сірки на металевих матрицях // *Мікробіол. журн.* — 2006. — Т. 68, № 5. — С. 80–86.
16. *Vilain S., Pretorius J. M., Theron J., Brozel V.* DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms // *Appl. Environ. Microbiol. Appl. And Envr.* — 2009. — V. 75, N 9. — P. 2861–2868.
17. *Андреюк К. І., Козлова І. П., Коптева Ж. П. та ін.* Мікробна корозія підземних споруд. — К.: Наук. думка, 2005. — 259 с.

**ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРИ
ЕКЗОПОЛІМЕРНОГО КОМПЛЕКСУ
БІОПЛІВКИ КОРОЗІЙНО-АКТИВНИХ
БАКТЕРІЙ**

*М. О. Борецька*¹
*О. С. Суслова*²
*В. Ф. Горчев*³
*С. А. Карахім*³

¹Інститут мікробіології та вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

²УНЦ «Інститут біології» КНУ
імені Тараса Шевченка, Київ

³Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

E-mail: mashapro@ukr.net

Досліджено вуглеводні та протеїнові компоненти біоплівки, що сформована на поверхні маловуглецевої сталі корозійно-активними бактеріями *Thiobacillus thioparus* 224M і гетеротрофним супутником *Stenotrophomonas maltophilia* 22M. Встановлено, що за сумісного культивування у складі екзополімеру з'являються моносахариди, що раніше не зустрічались у складі матриксу монокультур (рамноза, рибоза, ксиліоза, галактоза). За допомогою конфокального лазерного конфокального мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) вивчено просторову локалізацію компонентів матриксу біоплівки. Використання флуоресцентно-міченого лектину Concanavalin A (Sigma, США) та протеїнспецифічного барвника Thiazine Red (Sigma, США) дало змогу виявити структурні особливості біоплівки, пов'язані з просторовою локалізацією компонентів. Отримані дані з вивчення структури і функцій біоплівок є важливими для розуміння механізмів утворення таких форм у природі, медицині, промисловості.

Ключові слова: біоплівка, екзополімерний комплекс, флуоресценція, бактерії циклу сірки.

**STUDY OF THE BIOFILM EXOPOLIMERIC
COMPLEX STRUCTURE FORMED
BY CORROSIVE BACTERIA BIOFILM**

*M. O. Boretska*¹
*O. S. Suslova*²
*V. F. Gorchev*³
*S. A. Karahim*³

¹Zabolotny Institute of Microbiology and
Virology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

²Ukrainian National Center «Institute
of Biology» Kyiv National Taras Shevchenko
University

³Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: mashapro@ukr.net

Carbohydrate and protein components of the biofilm formed corrosion active bacteria *Thiobacillus thioparus* 224M and heterotrophic satellite of *Stenotrophomonas maltophilia* 22M on the mild steel surface were studied. It was found that the cocultivation leads to appear of monosaccharides not previously encountered in the matrix of monocultures (rhamnose, ribose, xylose, galactose). By confocal laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) it was studied the spatial localization of components of the biofilm matrix. Using fluorescently labeled lectin Concanavalin A (Sigma, USA) and dye binding with protein Thiazine Red (Sigma, USA) allowed to show the structural features of biofilm-related spatial localization of components. The obtained data for studying of the structure and function of biofilms are important for understanding the mechanisms of natural biofilms, medicine and respective industries.

Key words: biofilm, exopolymeric complex, fluorescence, sulfur cycle bacteria.