

побегов, что в свою очередь отразится на площади проекции кроны, а также на её светопрозрачности и, как следствие, на температуре и влажности под пологом.

#### **Список литературы / References:**

1. Milne R. Dynamics of swaying *Picea sitchensis*. *Tree Physiology*, 1991, no. 9, pp. 383-399.
2. Moore J.R., Maguire D.A. Simulating the dynamic behavior of Douglas-fir trees under applied loads by the finite element method. *Tree Physiology*, 2008, no. 28, pp. 75-83.
3. Netsvetov M., Nikulina V. Seasonal variations of oscillation and vibration parameters of *Acer platanoides* L. *Dendrobiology*, 2010, vol. 64, pp. 37-42.
4. Sellier D., Fourcaud T. Crown structure and wood properties: influence on tree sway and response to high winds. *American Journal of Botany*, 2009, vol. 96, no. 5, pp. 885-896.
5. Нецветов М.В. Влияние аэродинамического сопротивления листьев на колебания ствола клена ложноплатанового. *Лесоведение*, 2012, № 1, с. 56-64. [Netsvetov M. The influence of aerodynamic resistance of the leaves by the vibration of the trunk of the sycamore. *Forestry*, 2012, no. 1, pp. 56-64. (In Russ.)]
6. Niklas K.J. *Plant biomechanics: an engineering approach to plant form and function*. Chicago: University of Chicago Press., 1992, 622 p.
7. Нецветов М.В., Сулова Е.П. Механическая устойчивость деревьев и кустарников к вибрационным нагрузкам. *Промышленная ботаника*, 2009, вып. 9, с. 60-67. [Netsvetov M.V., Suslova H.P. Mechanical stability of trees and shrubs to vibratory loads. *Industrial botany*, 2009, vol. 9, pp. 60-67. (In Russ.)]
8. Niklas K.J., Spatz H.-C. Worldwide correlations of mechanical properties and green wood density. *American Journal of Botany*, 2010, vol. 97, no. 10, pp. 1587-1594.
9. Niklas K.J. *Plant allometry: The scaling of form and process*. Chicago: University of Chicago Press., 1994, 360 p.
10. Chudinov B.S., Stepanov V.I. Phase mixture of water in frozen wood. *Holtztechnologie*, 1968, vol. 9, no. 1, pp. 14-18.
11. Ilic J. Advantages of pre-freezing for reducing shrinkage-related degrade in eucalyptus: General considerations and review of literature. *Wood Science and Technology*, 1995, vol. 29, no. 4, pp. 277-285.
12. Mishiro A., Asano I. Mechanical properties of wood at low temperatures: effect of moisture content and temperature on bending properties of wood. Part I. Moisture content below the fiber saturation point. *Journal of Japanese Wood Res. Soc.*, 1984, vol. 30, no. 3, pp. 207-213.
13. Mishiro A., Asano I. Mechanical properties of wood at low temperatures: effect of moisture content and temperature on bending properties of wood. Part II. Moisture content beyond the fiber saturation point. *Journal of Japanese Wood Res. Soc.*, 1984, vol. 30, no. 4, pp. 277-286.

#### **ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОПЛЕНКИ, СФОРМИРОВАННОЙ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО СТЕНДА**

Погорелова М.А., Кузнецов А.Л., Левачева М.А. Суворов О.А., Ипатова Л.Г.  
ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН  
г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ  
e-mail: [agpogorelov@rambler.ru](mailto:agpogorelov@rambler.ru)

**Аннотация.** Биопленка представляет собой сообщество разных видов, не конкурирующих микроорганизмов, которые образуют многофункциональный симбиоз сложной архитектуры. По всем признакам такую колонию следует рассматривать, как биологическую ткань, обладающую особыми свойствами. В их ряду способность к самоорганизации посредством формирования гликопротеинового матрикса, который за счет адгезии к подложке образует комфортную среду обитания. Отметим химическую агрессивность, как способ закрепления на поверхности и получения субстратов, но одновременно причина коррозии самых стойких материалов. Далее, биологическая активность, которая выражается в неконтролируемом воспроизводстве даже при гипоксии, ограниченном только доступностью ресурсов. Многослойная пространственная организация, наличие механизмов поддержания гомеостаза, способность к быстрой мутации делает биопленки устойчивыми к действию многих химических, физических или бактериологических факторов. Этим же объясняется феноменальная резистентность биопленки к антибиотикам широкого спектра действия.

**Ключевые слова:** реактор биопленок, полимерный матрикс, 3D микробиологический симбиоз, сканирующая электронная микроскопия, электрохимически активированная вода

## ELECTRON MICROSCOPY OF A BIOFILM FORMED IN A LABORATORY STAND

Kusnezov A.L., Levacheva M.A., Suvorov O.A., Pogorelova M.A., Ipatova L.G.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS

Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

e-mail: agpogorelov@rambler.ru

**Abstract.** Biofilm is a community of different types of non-competing microorganisms that form a multi-functional symbiosis of complex architecture. By all indications, such a colony should be regarded as a biological tissue possessing special properties. In their series, the ability to self-organization through the formation of glycoprotein matrix, which due to adhesion to the substrate forms a comfortable habitat. We note the chemical aggressiveness as a way of fixing on the surface and source of substrates, but at the same time the cause of corrosion of the most resistant materials. Next, we note the biological activity, which is expressed in uncontrolled reproduction, even under hypoxia, limited only by the availability of resources. Multilayer spatial organization, the presence of mechanisms for maintaining homeostasis, makes biofilms resistant to many chemical, physical or bacteriological factors, including disinfection. This explains the phenomenal resistance of biofilms to broad-spectrum antibiotics. This work was supported by the Russian Science Foundation grant 17-76-20014.

**Key words:** flow cell biofilm reactor, polymeric matrix, 3D bacterial communities, scanning electron microscopy, electrochemically activated water

При универсальной способности к выживанию биопленка становится источником устойчивого бактериального и химического заражения сельскохозяйственной продукции, причиной сокращения сроков ее хранения, а также механического повреждения технологических элементов агропромышленной индустрии. Значительное увеличение доз препаратов и/или времени обработки не оправдывает себя не только из-за их относительной неэффективности, но и по причине вреда, наносимого окружающей среде. С учетом специфических особенностей, актуальным является разработка принципиально новых способов удаления биопленки, которые были бы эффективными, оставаясь одновременно безопасными для экологии [1]. Сформулированная проблема решается посредством применения электрохимически активированных водных растворов [2-5], которые в метастабильном состоянии обладают выраженными бактерицидными свойствами, но при переходе в стационарное состояние трансформируются в обыкновенную воду.

Биопленка спонтанно формируется на границе между водным раствором и твердой поверхностью, образуя сообщество, как правило, нескольких видов микроорганизмов [6]. Этот многоклеточный слой может включать в себя бактерии, простейшие одноклеточные и грибы, которые кооперируются в симбиоз. Важной структурной компонентой такой микробиологической колонии является внеклеточный матрикс [7], в состав которого входят в основном полисахариды, а также белки, протеогликаны, гликолипиды, иногда встречается внеклеточные нуклеиновые кислоты. Основная функция матрикса заключается в том, чтобы формировать архитектуру биопленки, снабжать ее питательными веществами, регулировать внутренний гомеостаз, обеспечивать обмен генетической информацией [8]. К сожалению, мало известно об особенностях строения и свойствах этой структуры. Наиболее комфортные условия для биопленки создаются в проточной системе, обогащенной субстратами, необходимыми для деления и роста микроорганизмов [9-12].

В процессе роста биопленки у нее появляется устойчивость к дезинфекции [13]. Такая особенность может создавать значительные проблемы в здравоохранении и быту, вызывая ряд заболеваний и загрязняя воду, а также в агропромышленном комплексе, повреждая оборудование и технологические линии. О механизме такой резистентности можно только догадываться, но сложная пространственная организация биопленки и разнообразие заселяющих ее видов делают возможным выживаемость микроорганизмов в самых экстремальных условиях.

Отметим трудность сравнительной оценки качества разрабатываемых подходов, что обусловлено отсутствием специальных стендов, позволяющих воспроизводить и контролировать условия в модельном эксперименте [14-19]. К основным факторам, которые формируют пленку в виде многоклеточного ансамбля, относятся: разнообразие клеточной популяции, внеклеточный матрикс и следы цитоплазмы, которые остаются после того, как клетки переходят из пленки в планктонную форму. В комплексе, развитие методов анализа перечисленных компарментов и создание лабораторных стендов позволит понять принципы формирования биопленки и оценить эффективность методов ее удаления. Решение рассматриваемой проблемы может иметь наиболее значимый эффект в нескольких важных агропромышленных технологиях. В их ряду следует выделить следующие: (i) удаление биопленки в транспортной системе жидкости с застойными зонами, как модель трубопровода сложной конфигурации, (ii) удаление биопленки с поверхности внутренней полости пористого материала, как модель гидропонного покрытия в тепличном производстве, (iii) удаление посредством нанодисперсного аэрозоля биопленки, сформированной на шероховатой поверхности, как модель плодово-овощной продукции.

Современное состояние исследований по проблеме дезинтеграции биопленок оценивали на основе анализа данных, опубликованных в специализированных изданиях. Рассматриваемая проблема достаточно широко представлена в текущей литературе, но основной объем данных имеет феноменологический характер. Особенно большой пробел знаний наблюдается в области стендового тестирования протоколов индуцированной деградации биопленки. Примером в данном направлении может служить работа по изучению формирования

био пленки *in vitro* [11]. Только в одной публикации мы обнаружили экспериментальное моделирование роста био пленки в условиях турбулентного потока водного раствора в трубке с застойными зонами [12]. К сожалению, результатов изучения пространственно более сложных систем, например полости в пористом материале, не найдено, хотя такая модель покрывает ряд важных технологий агропромышленного комплекса. Конечно, не осталась без внимания проблема дезинфекции пленочного образования в трубопроводе, на чем акцент делается, например, в области стоматологии [20]. Суммируя, отметим отсутствие комплексного системного подхода к изучению формирования и деградации био пленки в сличительных экспериментах, что не позволяет воспроизводить эффекты в контролируемых условиях с заданными параметрами.

#### Объект и методы исследования.

Препараты био пленки готовили посредством методики, описанной ранее [21-24]. Образец трубки длиной около 10 мм разрезали на две части по направляющей линии. С целью фиксации био пленки, образованной на поверхности трубки, обе половинки помещали на 12 часов в 1,5% раствор глутарового альдегида (4°C) с последующей постфиксацией в 1% водном растворе тетраоксида осмия (OsO<sub>4</sub>). После фиксации препарат дегидратировали при 4°C последовательно в двух водных растворах этанола возрастающей концентрации (50%, 75%), а на заключительном этапе в абсолютном этаноле. Для удаления этилового спирта образцы переносили на 30 минут 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 рельеф био пленки на поверхности трубки изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ, используя режим вторичных электронов.

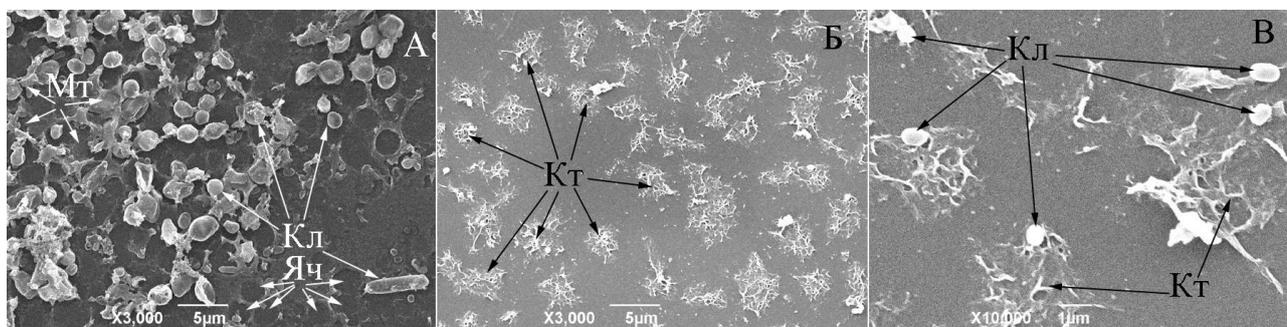


Рисунок 1 – Сканирующая электронная микроскопия био пленки, сформированной на поверхности внутренней стенке трубки лабораторного стенда: (А) зрелая био пленка, (Б) фрагменты био пленки после очистки внутренней поверхности трубки, (В) тот же участок внутренней поверхности трубки при большем увеличении.

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

#### Результаты и обсуждение.

На рисунке 1 приведены микрофотографии био пленки, сформированной на поверхности внутренней стенке трубки рециркуляционной системы лабораторного стенда бифидобактериями. Изначально планктонная форма микроорганизмов находилась в потоке питательной среды. Видно (рис.1А), что отдельные клетки встроены в тело зрелой био пленки. Во внеклеточном матриксе идентифицируются пустые ячейки, которые образуются в результате отслоения клеток при выделении вторичной планктонной формы для колонизации других участков поверхности. Изображение поверхности после ее частичной очистки от био пленки показано на микрофотографии 1Б. В результате кратковременной (15 минут) обработки рециркуляционной системы посредством электрохимически редуцированной воды (католит) произошла дезинтеграция пленки. Однако остались фрагменты деградированного матрикса, которые не визуализируются при изучении в оптическом микроскопе. На рисунке 1В показан тот же участок внутренней поверхности трубки при большем увеличении, где видны одиночные клетки, встроены в кластеры матрикса, которые могут быть причиной быстрой регенерации био пленки. Исследование поддержано Российским научным фондом, проект № 17-76-20014.

#### Список литературы / References:

1. Bridier A., Briandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 2014, vol. 27, pp. 1017-1032.
2. 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, pp. 379-384.
3. Ozaki M., Oyshima T., Mukumoto M., Konishi H., Hirashita A., Maeda N., Nakamura Y. A study for biofilm removing and antimicrobial effects by microbubbled tap water and other functional water, electrolyzed hypochlorite water and ozonated water. *Dental Materials J.*, 2012, vol. 31, pp. 662-668.

4. Whangchai K., Uthaibutra J., Phiyanalinmat S. Effect of NaCl concentration, electrolysis time, and electrical potential on efficiency of electrolyzed oxidizing water on the mortality of *PENICILLIUM DIGITATUM* in suspension. *Acta Hortic.*, 2013, vol. 973, pp. 26-32.
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, pp. 265-273.
6. 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, pp. 135-142.
7. 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, pp. 259-265.
8. Wilking J.N., Angelini T.E., Seminara A., Brenner M.P., Weitz D.A. Biofilms as complex fluids. *MRS Bulletin*, 2011, vol. 36, pp. 385-391.
9. Hansen M.C., Palmer R.J. Jr., White D.C. Flowcell culture of *Porphyromonas gingivalis* biofilms under anaerobic conditions. *J. Microbiol. Methods*, 2000, vol. 40, pp. 233-239.
10. Goeres D.M., Loetterle L.R., Hamilton M.A., Murga R., Kirby D.W., Donlan R.M. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology*, 2005, vol. 151, pp. 757-762.
11. Crusz S.A., Popat R., Rybtke 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, pp. 835-842.
12. Drescher K., Shenb Yi., Bassler B.L., Stone H.A. Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. *PNAS*, 2013, vol. 110, pp. 4345-4350.
13. Escalona E.S. Design of an Experimental Approach to Study the Growth of Biofilm on Polymethylmethacrylate. *A Senior Project*, 2013, pp. 1-23.
14. Finlay J.A., Schultz M.P., Cone G., Callow M.E., Callow J.A. A novel biofilm channel for evaluating the adhesion of diatoms to non-biocidal coatings. *Biofouling*, 2013, vol. 29, pp. 401-411.
15. Billings N., Rusconi R., Stocker R., Ribbeck K. Microfluidic-based Time-kill Kinetic Assay. *Bio-protocol*, 2014, vol. 4, pp. 1-6.
16. 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, pp. e84837- e84837.
17. Maierl M., Jörger M., Rosker P., Reisner A. *In vitro* dynamic model of a catheterized bladder and biofilm assay. *Bio-protocol*, 2015, vol. 5, pp. 1-9.
18. Espeso D.R., Carpio A., Martínez-García E., de Lorenzo V. Stenosis triggers spread of helical *Pseudomonas* biofilms in cylindrical flow systems. *Nature scientific reports*, 2016, vol. 6, pp. 1-10.
19. Peterson S.B., Irie Y., Borlee B.R., Murakami K., Harrison J.J., Colvin K.M., Parsek M.R. Different methods for culturing biofilms *in vitro*. In: *Biofilm Infections*, Bjarnsholt et al. (eds.), 2016, Springer Science+Business Media.
20. Boyle M.A., O'Donnell M.J., Russell R.J., Coleman D.C. Lack of cytotoxicity by Trustwater Ecasol used to maintain good quality dental unit waterline output water in keratinocyte monolayer and reconstituted human oral epithelial tissue models. *J Dent.*, 2010, vol. 38, pp. 930-940.
21. Погорелов А.Г., Гаврилюк В.Б., Погорелова В.Н., Гаврилюк Б.К. Сканирующая электронная микроскопия раневых покрытий из биосинтетических материалов типа «Биокол». *Клеточные технологии в биологии и медицине*, 2012, №3, с. 176-180. [Pogorelov A.G., Gavriluk V.B., Pogorelova V.N., Gavriluk V.B. Scanning Electron Microscopy of Biosynthetic Wound Dressings Biocol. *Bul. Exp. Biol. Med.*, 2012, vol. 154, pp. 167-170. (In Russ.)]
22. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А., Гурьев Е.Л., Ломинадзе Г.Г. Современные технологии исследования бактериальных биопленок. *Современные технологии в медицине*, 2013, т. 5, с. 14-20. [Chebotar I.V., Pogorelov A.G., Yashin V.A., Guryev E.L., Lominadze G.G. Modern Technologies of Bacterial Biofilm Study. *Modern Technologies in Medicine*, 2013, vol. 5, pp. 14-18. (In Russ.)]
23. Погорелов А.Г., Чеботарь И.В., Погорелова В.Н. Изучение микробной биопленки на внутренней поверхности катетера методом сканирующей электронной микроскопии. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, 2014, № 2, с. 133-136. [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, pp. 711-713. (In Russ.)]
24. Фирсова В.Г., Паршиков В.В., Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Погорелов А.Г. Микробиологическая диагностика и выбор антимикробной терапии инфекции желчевыводящих путей. *Анналы хирургической гепатологии*, 2015, т. 20, с. 124-131. [Firsova V.G., Parshikov V.V., Chebotar I.V., Lazareva A.V., Pogorelov A.G. Microbiological diagnosis and choice of antibacterial therapy of biliary infection. *Ann. Surgery Hepatology*, 2015, vol. 20, pp. 124-131. (In Russ.)]