

М.А. Борецкая¹, О.С. Сулова²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, ДО 3680

²УНЦ «Институт Биологии» КНУ им. Тараса Шевченко, ул. Академика Глушкова, 2

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ПЛАНКТОНА И БИОПЛЕНКИ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* 22M

Определены оптимальные методы выделения экзополимерного комплекса *Stenotrophomonas maltophilia* 22M, синтезируемые в условиях планктона и биопленки на поверхности малоуглеродистой стали. Для изучения состава экзополимера (углеводов и белков) желательнее использовать разные физические и химические методы в зависимости от формы роста бактерий.

Так, для планктонной формы роста наиболее эффективным было взаимодействие с ионообменной смолой (9,5 мг/мл) для определения максимального количества углеводов, и воздействие нагреванием для определения белка (3,9 мг/мл). Для экзополимера биопленки с целью получения максимального количества углеводов рекомендуется использовать нагревание (30 мг/мл) и центрифугирование (35 мг/мл). Определения белка в экзополимере биопленки рекомендуется проводить после обработки нагреванием (3,75 мг/мл) и центрифугированием (3,75 мг/мл).

Ключевые слова: экзополимерный комплекс, биопленка, коррозионноактивные бактерии.

Микробные популяции на твердых поверхностях способны к образованию высокоорганизованных структур – биопленок. Процесс такого формирования начинается с этапа перехода свободно плавающих планктонных форм к прикрепленным. С помощью слизистой капсулы, бактерии адгезируются к субстрату и формируют микро- и макроколонии. Согласно данным литературы, состав экзополимера планктонных клеток и клеток биопленки отличается [9]. Слизистый матрикс защищает биопленку от негативных факторов окружающей среды (биоцидов, атак фагов, физико-химического воздействия) [8, 10].

Для качественного и количественного анализа экзополимера (ЭПК) применяют широкий спектр физических и химических методов. Среди физических методов широкое применение нашли нагревание, центрифугирование, фильтрация, ультразвуковая обработка [5]. Химические включают экстракцию химическими реагентами, такими как этилендиамин тетрауксусной кислоты (ЭДТА), NaOH, NaOH-формамид, уксусная кислота [9]. Анализ литературы показывает необходимость предварительного подбора соответствующего метода выделения ЭПК для анализа тех или иных его компонентов. Так, по данным Pan X. et al. [11], наиболее эффективным методом для отделения общего экзополимерного комплекса от клеток применялась обработка ЭДТА. Для максимального выделения углеводов в составе ЭПК, по данным Taria J. M. et al., эффективно использовался метод нагревания и центрифугирования [12].

Изучение состава экзополимерного комплекса биопленок также важно для разработки методов защиты от микробно индуцированной коррозии. *Stenotrophomonas maltophilia* является неотъемлемым компонентом коррозионноактивного сообщества и природным ассоциантом ацидофобных тионовых бактерий *Thiobacillus thioparus*. Согласно проведенным ранее исследованиям, формирование биопленки ассоциацией *S.maltophilia* и *T. thioparus* на поверхности малоуглеродистой стали более активное, а скорость коррозии значительно выше, по сравнению с монокультурой *T. thioparus* [2]. Предполагается, что регулировка продукции гетеротрофными бактериями *S.maltophilia* слизистого экзополимера и его состава поможет существ-

венно влиять на коррозионные процессы в грунтах. Для изучения механизмов данного процесса необходимо подобрать оптимальный метод выделения ЭПК, а также определить способ максимального выделения отдельных его компонентов.

Целью нашей работы было сравнительное изучение оптимальных физических и химических методов для экстракции ЭПК клеток биопленки и планктона *S.maltophilia* 22М.

Материалы и методы. *Объекты исследования.* В эксперименте использовался штамм *Stenotrophomonas maltophilia* 22М, выделенный из-за туннелей киевского метрополитена на глубине залегания палеогенных и неогенных слоев грунта [3]. Изучали ЭПК биопленки, сформированной поверхности малоуглеродистой стали.

Подготовка стальных пластин. Подготовка стальных пластин марки ВСтЗСП (40×15 мм) проводилась согласно литературным данным [1].

Культивирование S.maltophilia 22М и получение биопленки и планктона. Обработанные пластины погружали в среду Старки №2 (в г/1000 мл H₂O : KH₂PO₄ -4; K₂HPO₄ -4; Na₂S₂O₃ - 10; MgSO₄ - 0,1; CaCl₂ - 0,1; NH₄Cl - 0,1; FeCl₃ - 0,02; MnSO₄ - 0,02), инокулировали 2-х суточной культурой *S.maltophilia* 22М. Культивировали при температуре 28 °С в течении 4 суток.

После культивирования клетки биопленки и экзополимерный матрикс снимали со стальных пластин с помощью ультразвука 22 кГц в течении 2 мин на ледяной подушке. Планктонные клетки отбирали из культуральной жидкости. Для осаждения продуктов коррозии и солей питательной среды образцы биопленки и планктона центрифугировали при 1.5 rpm (revolutions per minute) 15 мин (Eppendorf Centrifuge 5810R, USA) при температуре 5 °С. После центрифугирования оптическую плотность супернатанта планктона и биопленки приводили к единому показателю 0,2 (КФК-3-01, Россия), кювета 1,5 мм, λ 540 нм, относительно дистиллированной воды).

Выделение экзополимерного комплекса. Экзополимерный комплекс экстрагировали из бактериальных культур, используя пять методов: 2 химических (воздействие NaOH и формальдегида в комплексе с NaOH); 3 физических (влияние ионообменной смолы, нагревания, центрифугирования).

Для отделения ЭПК от клеток биопленки и планктона применяли следующие методы (на 10 мл культуральной жидкости):

Воздействие раствором NaOH (2 мл 1н NaOH) при температуре 4⁰С, 3 часа;

Воздействие 40 % раствором формальдегида (20 мкл), экспозиция 1 час при 4⁰С с последующим добавлением 1М NaOH (2,8 мл), экспозиция 3 часа;

Взаимодействие с ионообменной смолой КУ²⁺ (35 г) 2 часа, температура 4⁰С, при постоянном помешивании;

Выдерживание культуральной жидкости в запаянных ампулах 1 час при 70⁰С.

После обработки вышеуказанными методами образцы центрифугировали 30 мин при 11,9 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, USA) и температуре 4⁰С.

При таких же условиях центрифугировали 10 мл необработанной культуральной жидкости как биопленки, так и планктона.

Супернатант фильтровали через мембранные фильтры 0,22 мкм (Syringe Filter with 0,2 μm Supor Membrane, PALL, Life Science). Фильтрат диализовали против дистиллированной воды (1 л /10 мл образца) используя диализные трубки с диаметром пор 3.500 MWCO (Sigma, USA) 24 часа.

Определение углеводного и белкового компонентов ЭПК. Общее количество углеводов определялось фенол-серным методом, стандарт – глюкоза, λ 490 нм, кювета 1,5 мм [6]. Общее количество белка – методом Bradford (стандарт – бычий альбумин (Sigma, USA), λ 590 нм, кювета 1,5 мм [4]. Оптическую плотность определяли с помощью спектрофотометра КФК-3-01 (Россия).

Результаты и их обсуждение. Было использовано пять методов экстракции ЭПК, сформированных клетками гетеротрофного спутника коррозионноактивных бактерий цикла серы *S.maltophilia* 22М разных форм роста в присутствии малоуглеродистой стали.

Методы воздействия нагреванием и центрифугирование без дополнительной обработки оказались наиболее эффективными для определения углеводов в экзополимерном матриксе биопленки *S. maltophilia* 22M. Так, количество углеводов, выделенное этими методами составляло 30 мкг/мл и 35 мкг/мл соответственно (рис. 1).

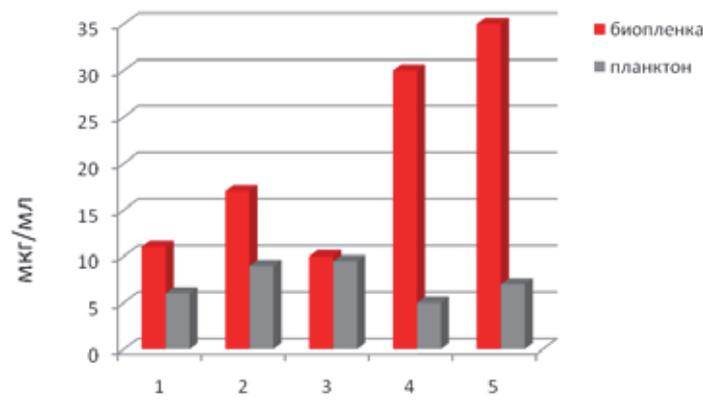


Рис. 1. Содержание общего количества углевода в экзополимерном комплексе *Stenotrophomonas maltophilia* 22M разных форм роста при воздействии NaOH (1), NaOH с формалином (2), ионообменной смолой (3), нагреванием (4), центрифугированием без обработки (5).

Следует отметить, что использование тех же методов для выделения компонентов экзополимера планктона привело к получению результатов в среднем ниже, чем в варианте с экзополимером биопленки (рис. 1). Наиболее эффективным методом считали влияние ионообменной смолы (9,5 мкг/мл).

Обработка выбранными методами с целью выделения и оценки общего белка в ЭПК показала, что наиболее эффективным методом для определения состава матрикса биопленки является влияние физических методов – нагревание (3,75 мкг/мл) и центрифугирование (3,75 мкг/мл) (рис. 2). Для ЭПК планктона наибольший показатель был отмечен при воздействии нагреванием (3,9 мкг/мл).

Таким образом, для проведения качественного изучения его состава ЭПК необходимо максимально извлечь все его составляющие, применяя различные методы.

Следует отметить значительную разницу во влиянии одних и тех же методов экстракции на ЭПК разного происхождения. По-видимому, это связано с тем, что клетки планктона пребывают в свободном движении, тогда как клетки биопленки вынуждены находиться в контакте не только с поверхностью, но и, по данным Flemming Н.-С. [7], формируют очень прочные связи друг с другом, образуя конгломераты.

При определении общего белка в ЭПК биопленки *S.maltophilia* 22M рекомендуется использовать физические методы: нагревание и центрифугирование. Для планктонной формы роста – нагревание и обработка 1н NaOH.

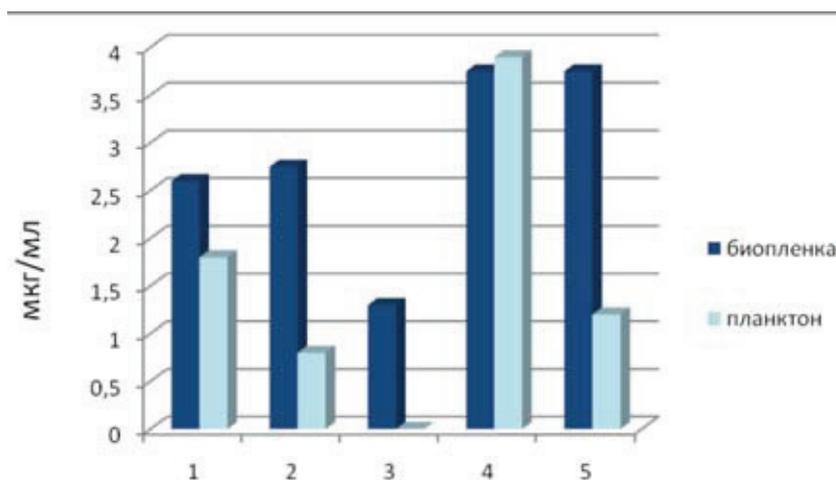


Рис. 2. Содержание общего количества белка в экзополимерном комплексе *Stenotrophomonas maltophilia* 22M разных форм роста при воздействии NaOH (1), NaOH с формалином (2), ионообменной смолой (3), нагреванием (4), центрифугированием без обработки(5).

Необходимо учитывать особенности формы роста микроорганизмов при выделении ЭПК биопленки, так как степень разрушения связей между клетками, клетками и поверхностью может существенно сказаться на качестве и количестве выделенного ЭПК. Таким образом, в данной работе отмечено значительную разницу в эффективности некоторых методов в зависимости от формы роста.

Так как экзополимерный комплекс является важным компонентом в механизме формирования биопленки, и переход от планктонной формы роста к биопленочной является ключевым в коррозионоактивных процессах – этот комплекс требует более детального изучения.

М.О. Борецька¹, О.С. Сулова²

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

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Україна

МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ ЕКЗОПОЛІМЕРНОГО КОМПЛЕКСУ ПЛАНКТОНУ ТА БІОПЛІВКИ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* 22M

Резюме

Визначені оптимальні методи виділення екзополімерного комплексу *Stenotrophomonas maltophilia* 22M, що синтезуються в умовах планктону та біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі. Для вивчення складу екзополімеру (вуглеводів та білків) бажано використовувати різні фізичні та хімічні методи залежно від форми росту. Так, для планктонної форми росту найбільш ефективною була взаємодія з іонообмінною смолою (9,5 мкг/мл) для визначення максимальної кількості вуглеводів і вплив нагріванням для визначення білку (3,9 мкг/мл). Для екзополімеру біоплівки з метою отримання максимальної кількості вуглеводів бажано використовувати нагрівання (30 мкг/мл) та центрифугування (35 мкг/мл). Визначення білку в екзополімері рекомендується проводити після обробки нагріванням (3,75 мкг/мл) та центрифугуванням (3,75 мкг/мл).

Ключові слова: екзополімерний комплекс, біоплівка, корозійноактивні бактерії.

**METHODS FOR EXTRACTION OF EXOPOLYMERIC COMPLEX
IN PLANKTON AND BIOFILM GROWTH MODE
OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* 22M**

S u m m a r y

The optimal methods for the extraction of exopolymeric complex (EPS) of *Stenotrophomonas maltophilia* 22M was determined. That EPS was synthesized in plankton and biofilm growth mode on the mild steel surface. It is desirable to use different physical and chemical methods for studying the EPS composition (carbohydrates and proteins) depending on the bacteria growth mode. In this way the interaction with ion exchange resin was the most effective for plankton growth mode to determine the maximum amount of carbohydrates (9.5 µg/ml), and the impact of heating to determine protein (3.9 µg / ml). For EPS biofilm in order to obtain maximum amount of carbohydrate it is desirable to use heating (30 µg/ml) and centrifugation (35 µg/ml). It is recommended to determine protein in the biofilm EPS after treatment with heating (3.75 µg/ml) and centrifugation (3.75 µg/ml).

The paper is presented in Russian.

Key words: exopolymeric complex, biofilm, corrosion active bacteria.

The author's address: Boretska M.O., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Асауленко Л.Г., Пуріш Л.М., Козлова І.П. Етапи формування біоплівки сульфідвідновлювальними бактеріями // Мікробіол. журн. – 2004. – 66, №3. – С. 72–79;
2. Борецька М.О., Козлова І.П. Вплив екзополімерів біоплівки на швидкість мікробної корозії маловуглецевої сталі // Там само. – 2007. – 69, №4. – С. 40–44;
3. Протасова М.О., Собко В.М., Козлова І.П. Адгезія і колонізація поверхні скла *Thiobacillus thioarparus* та *Stenotrophomonas maltophilia* та їх бінарною культурою // Там само. – 2005. – 67, №6. – С 57-63.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
5. Comte S., Guibaud G., Baudu M. Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation // J. Hazard. Mater. –140, (1-2). – P. 127–129.
6. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. – 1956. –28, N 3. –P.350–356.
7. Flemming H.-C., Neu T.R., Wozniak D. J. The EPS matrix: the "house of biofilm cell" // J. Bacteriol. – 2007. – 189, N 22. – P. 7945–7947.
8. Gehrke T., Telegdi J., Thierry D. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching // Appl. and Environ. Microbiol. – 1998. – 64, N 7. – P. 2743–2747.
9. Melanie J. Brown, John N. Lester Comparison of Bacterial Extracellular Polymer Extraction Methods // Ibid. – 40, N 21980. – P. 179–185.
10. O'Tool G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – 54, N 6. – P. 49–79;
11. Pan X., Liu J., Zhang D., Li L., Song W., Yang J. A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using three-dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy // Water SA. – 2010. – 36, N 1. – P. 111–115.
12. Tapia J. M., Munoz J. A., Gonza'lez F., Bla'zquez M. L., Malki M., Ballester A. Extraction of extracellular polymeric substances from the acidophilic bacterium *Acidiphilium* 3.2Sup (5) // Water Sci. and Tech. – WST. – 2009. – 59, N 10. – P. 1959–1963.

Отримано 17.03.2012