

Холодилина Т.Н., Васильченко А.С., Кондакова К.С.
Оренбургский государственный университет
E-mail: inst_bioelement@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СУБСТРАТА НА АДГЕЗИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

С использованием атомно-силовой микроскопии описаны наноструктурные изменения опытных целлюлозосодержащих комплексов с добавками кальция и магния. Определена пористость исследуемых субстратов. Выявлена зависимость адгезии модельных микроорганизмов от изучаемых физических свойств экструдатов.

Ключевые слова: экструзия, целлюлоза, кальций, магний, пористость, атомно-силовая микроскопия, шероховатость, адгезия бактерий.

Создание композиционных материалов, содержащих наполнители разного уровня дисперсности на базе лигниноцеллюлозной матрицы, является новым и перспективным направлением. Известно, что введение наночастиц металлов в полимерную матрицу целлюлозы позволяет получить материалы с улучшенными сорбционными свойствами, способными извлекать ионы меди, никеля и кадмия из водных растворов электролитов [3, 4]. Вопрос использования полисахаридов в качестве матриц для иммобилизации ферментов, наночастиц серебра и различных биологически активных веществ при отделке текстильных материалов, в качестве компонентов пищевых и косметических продуктов представлен в работах Фазиловой С.А., Югай С.М., Рашидовой С.Ш. [6]. Включение в состав природных полимеров микро- и наноразмерных частиц позволяет изменить сорбционно-кинетические свойства субстрата [5].

Несмотря на многообразие проводимых исследований в этой области действие металлоорганических комплексов на базе лигниноцеллюлозной матрицы на живой организм не достаточно описано. Ранее были получены данные по влиянию различных видов обработки на активацию биологических свойств металлоорганических комплексов [1]. Однако для более глубокого понимания особенностей влияния изучаемых опытных комплексов на организм необходимо изучение механизмов их взаимодействия с микрофлорой желудочно-кишечного тракта.

Целью данной работы является исследование зависимости физических характеристик изучаемых опытных комплексов (ОК): среднеквадратичной шероховатости, пористости и адгезии модельных микроорганизмов. Использование

атомно-силовой микроскопии (АСМ) для сканирования изучаемых комплексов открывает новые возможности исследования параметров системы микроорганизм-субстрат [7].

Материалы и методы исследования

На предварительном этапе исследований были отобраны образцы ОК на основе пшеничных отрубей (некрахмальных полисахаридов <15 %) с включением кальция и магнийсодержащих компонентов в карбонатной (в 5 %, 10 %, 20 %, 30 % от массовой доли продукта) и сульфатной (в 5 %, 10 %, 20 % от массовой доли продукта) форме. Полученные комплексы были последовательно оценены по ряду показателей: среднеквадратичная шероховатость, пористость и адгезия микроорганизмов.

Процесс экструзии ОК проводился на пресс-экструдере ПШ30/1 с установленной фильерой $d = 10$ мм и длиной 60 мм, частоте вращения шнека $n = 160$ об/мин. Для нормального протекания процесса экструдирования создавали давление 10 МПа и температуру 70-120 °С при влажности смеси 18-30 % с учетом массовой доли вносимой минеральной добавки.

АСМ-визуализация характера поверхности экструдатов производилась в следующей последовательности: для подготовки образцов сухая масса исходного продукта в количестве 1,5 г помещалась в стеклянные флаконы, куда также вносилось по 10 мл бидистиллированной воды. После чего в течение 30 мин производилась обработка образцов ультразвуком частотой 35 кГц в источнике ванного типа (ЗАО ПКФ «Сапфир», Россия). После ультразвуковой обработки, полученная суспензия помещалась в центрифугу при 4000 оборотах в течение 75 с.

Крупнодисперсная фракция осаждалась, а полученный супернатант в объеме 15 мкл наносился на поверхность свежесколотой слюды. Микроскопическое исследование препаратов производилось на атомно-силовом микроскопе SMM-2000 (ОАО ПРОТОН-МИЭТ, Россия) в контактном режиме в воздушной среде. При микроскопии использовались зонды для контактной атомно-силовой микроскопии MSCT-AUNM (Veeco, США), с жесткостью балки 0,03 н/м и радиусом кривизны зонда 10 нм. Количественный морфометрический анализ проводился с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

Исследования пористости образцов проведены с применением адаптированной методики оценки соответствующих физических свойств продукта [3].

Оценка адгезионной активности микроорганизмов проводилась по ранее представленной методике [2] с использованием микропланшетного люминометра LM-01T с термостатом, разработанного в Институте биофизики СО РАН совместно со специальным конструкторским технологическим бюро «Наука» (г. Красноярск) и модельного микроорганизма - *Escherichia coli K12 TG1* с клонированным *lux*-опероном *Photobacterium leiognathi 54D10*, выпускаемый «НВО Иммунотех» как биосенсор Эколюм-12. Количество адгезированных бактерий выражалось в %.

Полученные данные были обработаны с использованием стандартных статистических программ.

Результаты и их обсуждение

Результаты атомно-силовой микроскопии исследуемых опытных комплексов представлены в виде 2-D изображений на рисунке 1.

Включение в состав ОК минеральной составляющей (5 % CaCO_3) способствовало образованию кристаллических структур на поверхности субстрата (рис.1, А). В то же время увеличение дозировки до 10 % CaCO_3 способствовало более равномерному распределению минеральных веществ на поверхности субстрата и соответственно зрительному сглаживанию поверхности (рис.1, Б). Увеличение концентрации CaCO_3 до 20 % привело к частичному вкраплению кристаллов и продуктов распада к поверхности субстрата (рис.1, В). При 30 %

CaCO_3 в ОК наблюдалось вспучивание и практически полное вкрапление минерального вещества в основу субстрата.

Анализ АСМ-изображения образцов ОК с добавлением сульфатного комплекса кальция показал, что сульфаты фактически не подвергаются влиянию гидролиза. В частности 5 % данной минеральной добавки вызывало прилипание кристаллов к поверхности субстрата (рис. 1, Г). При концентрации в 10 % наблюдалась аналогичная картина, при этом на поверхности субстрата отмечались скопления большего размера (рис. 1, Д). При 20 % уровне вносимого минерального компонента также выявлялись крупные агрегаты на поверхности субстрата и просматривалась большая исчерченность рельефа, что возможно связано с механическим вкраплением минеральной добавки в ОК в условиях экстразионной обработки (рис. 1, Е).

Атомно-силовая микроскопия препарата ОК с карбонатным комплексом кальция и магния (5 %) позволила изучить его структуру на микро- и субмикронном уровне. Полученные АСМ-изображения показали, что данный образец оказался сформирован достаточно разреженной массой, среди аморфного вещества которого присутствуют оформленные агрегаты со

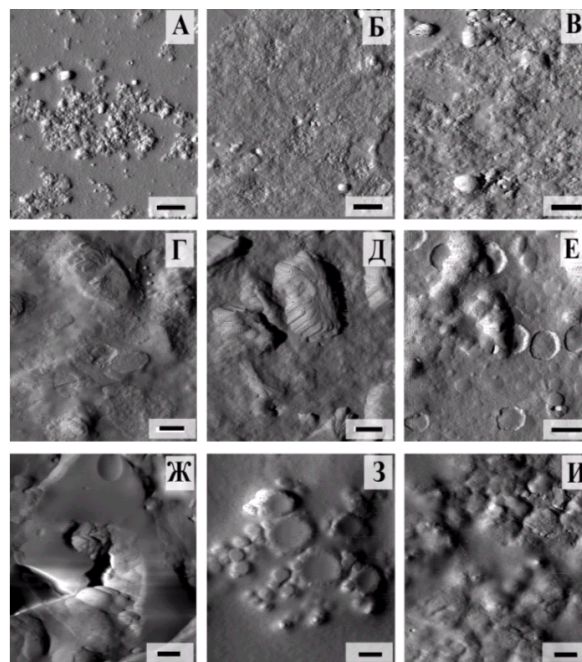


Рисунок 1. АСМ-изображения образцов экструдированных отрубей с добавлением CaCO_3 5 % (А), 10 % (Б), 20 % (В); CaSO_4 5 % (Г), 10 % (Д), 20 % (Е); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 % (Ж), 10 % (З), 20 % (И); Шкала – 1 мкм

средним диаметром $2,03 \pm 0,43$ мкм. При этом шероховатость поверхности препарата оказалась равной 47 нм.

Поверхность препарата экструдированных отрубей с добавкой $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 %) при визуализации характеризовалась развитым рельефом (рис. 1, Ж), измеренные значения шероховатости поверхности составили величину 155 нм. Тот же самый образец, но с большим процентным содержанием минеральной добавки (до 10 %) на АСМ-изображениях также описывался рельефной структурой поверхности (рис. 1, З), однако шероховатость поверхности оказалась меньше (111 нм). При этом в структуре образца оказалось возможным детектировать присутствие округлых объектов, в различной степени погруженных в аморфное вещество. Средние продольные значения подобных объектов оказались $0,93 \pm 0,66$ мкм. Увеличение процентного содержания минеральной добавки до 20 % результативалось в более выраженной агрегации частиц препарата между собой и видимо их химическом взаимодействии с субстратом (рис. 1, И), ведущем к формированию сравнительно сглаженного рельефа и снижению шероховатости поверхности образца до 91 нм.

В рамках групп ОК содержащих одноименные металлы-посредники выявлена тесная зависимость между изучаемыми физическими параметрами и адгезией модельных микроорганизмов. Так для образцов с включением карбоната кальция было получено, что с увеличением среднеквадратичной шероховатости поверхности до 233 нм увеличивается адгезионная активность микроорганизмов с 40,6 % до 93,3 %. При этом для значения показателя пористости наблюдалась обратная закономерность, чем выше адгезионная активность, тем ниже были ее значения (рис. 2).

По-видимому, большие значения пористости были связаны с наличием преимущественно макропор в субстрате, что в свою очередь характеризовалось в целом меньшей удельной поверхностью субстрата. Однако при внесении минеральной составляющей поверхность субстрата инкрустировалась кристаллами добавки, приобретая большую исчерченность, что сопровождалось увеличением микро- и мезопор и как следствие увеличением удельной поверхности. В то же время катионы и соот-

ветствующие оксиды металлов могли служить дополнительными связующими при контакте поверхности бактериальной клетки и целлюлозной матрице, что находит отражение в значительном нарастании степени адгезии клеток микроорганизмов при незначительном сдвиге показателей пористости субстрата.

Для группы с включением сульфатного комплекса кальция была выявлена аналогичная закономерность: среднеквадратичная шероховатость увеличивается со 104 нм до 807 нм, адгезия микроорганизмов с 52,3 % до 58,1 %, пористость уменьшается с 50,5 % до 36,3 % (рис. 2). При сравнении субстратов с включением сульфатов и карбонатов последние имели преимущество по показателю адгезивности: для сульфатного комплекса была характерна относительно низкая активность биосенсора.

При использовании в составе образцов карбоната магния адгезионная активность была наибольшей среди всех исследуемых субстратов, она достигала значения 99,7 % при 20%-м включении добавки, пористость согласно выявленной ранее закономерности так же уменьшалась со значения 51,1 % (адгезия 23,5 %) до значения 43,2 % (адгезия 97,1 %).

Несколько отличаются от общей тенденции результаты, полученные при анализе исследуемых физических характеристик субстрата с добавкой сульфатного комплекса магния. Значения среднеквадратичной шероховатости и пористости менялись незначительно, уменьшаясь с понижение концентрации минеральной добавки (рис. 2). При этом адгезия бактерий оставалась в среднем невысокой, но с увеличением со-

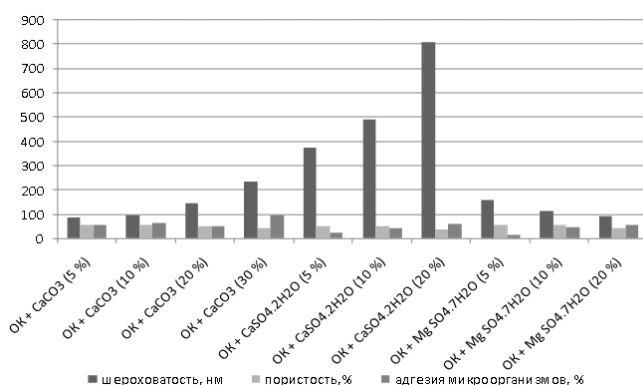


Рисунок 2. Показатели физических (шероховатость, пористость) и биологических (адгезия микроорганизмов) параметров экструдированных отрубей (ОК) с минеральными добавками

держания минеральной добавки возрастала с 14 до 54 %. Так как сульфат магния представляет собой растворимое соединение, то мы не наблюдаем образование агрегатов, характерных для выше описанных минеральных добавок и соответственно не находим значительных изменений шероховатости поверхности субстрата. Однако появление в результате гидролиза катионов магния, видимо, способствовало адгезии бактерий.

Таким образом, в ходе исследований нами была изучена микроструктура полученных ОК методом атомно-силовой микроскопии. Выявлена зависимость адгезии модельных микроорганизмов от изучаемых физических свойств экструдированных пшеничных отрубей с минеральными добавками. Отмечено, что на адгезию бактерий влияет как концентрация вводимого металла, так и его форма.

6.05.2013

**Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 12-04-31424 мол_а
«Механизмы адгезии микрофлоры к модифицированным металлоорганическим комплексам
с включением наночастиц»**

Список литературы:

1. Влияние различных видов воздействия на физические и биологические свойства кормов с разной степенью минерализации / М.Я. Курилкина, С.А. Мирошников, Т.Н. Холодилина, А.С. Кузнецова // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2010. - № 6. - С. 73-75.
2. Кондакова, К.С. Количественная оценка адгезии бактерий рубцовой жидкости к поверхности растительных субстратов на модели рекомбинантного штамма *Escherichiacoli* K12 TG1 с клонированным lux-опероном *Photobacterium leiognathi* 54D10 / К.С. Кондакова, Е.В. Япрынцева, Е.А. Дроздова // Вестник мясного скотоводства. - 2012. - вып. 78, №4. - С. 82-85.
3. Котельникова, Н.Е. Модификация льняных материалов частицами меди / Н.Е. Котельникова, А.М. Михаилиди // Химия растительного сырья. - 2009. - № 3. - С. 43-48.
4. К пониманию действия высокодисперсных порошков металлов на биодоступность компонентов экструдатов / М.Я. Курилкина, С.А. Мирошников, Т.Н. Холодилина, В.В. Ваншин // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2010. - № 6. - С. 147-151.
5. Курилкина, М.Я. Эффективность использования микропорошков металлов в составе экструдата при кормлении цыплят-бройлеров / М.Я. Курилкина, С.А. Мирошников, Т.Н. Холодилина // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4, № 32-1. - С. 169-171.
6. Фазилова, С.А. Структурные исследования полисахаридов и наноконпозиций на их основе / С.А. Фазилова, С.М. Югай, С.Ш. Рашидова // Химия растительного сырья. - 2010. - № 1. - С. 13-19.
7. Noncontact Atomic Force Microscopy and its related topics / S. Morita, F. Giessibl, Y. Sugawara, H. Hosoi, K. Mukasa, A. Sasahara, H. Onishi // Springer Hand book of Nanotechnology, SpringerBerlin. - 2004. - 13. - P. 141-178.

Сведения об авторах:

Холодилина Татьяна Николаевна, старший преподаватель кафедры экологии и природопользования Оренбургского государственного университета, кандидат сельскохозяйственных наук

Васильченко Алексей Сергеевич, старший преподаватель кафедры биохимической физики Оренбургского государственного университета

Кондакова Кристина Сергеевна, научный сотрудник института биоэлементологии Оренбургского государственного университета

460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, тел. (3532) 372482, e-mail: inst_bioelement@mail.ru

UDC 53.09:579.2

Holodilina T.N., Vasilchenko A.S. Kondakova K.S.

Orenburg state university, e-mail: inst_bioelement@mail.ru

RESEARCH OF INFLUENCE OF PHYSICAL PARAMETERS OF A SUBSTRATUM ON ADHESION OF MICROORGANISMS A METHOD OF NUCLEAR AND POWER MICROSCOPY

Nanostructural changes experienced cellulose complexes with calcium and magnesium have been described using atomic force microscopy. The porosity of the samples was determined. Adhesion of bacteria model was dependent on the physical properties of these extruded samples.

Key words: extrusion, cellulose, calcium, magnesium, porosity, atomic force microscopy, surface roughness, adhesion of bacteria.