

ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И УГЛЕРОДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Шаповал О.Г.¹, Нечаева О.В.¹, Шульгина Т.А.², Пучиньян Д.М.², Шуршалова Н.Ф.³

¹ГБОУ ВПО Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия (410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112), e-mail: ogshapoval@gmail.com;

²ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России, Саратов, Россия (410002, Саратов, ул. Чернышевского, 148), e-mail: sarniito-nauka@yandex.ru;

³ ГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов, Россия (410012, Саратов, ул. Астраханская, 83), e-mail: francissella@rambler.ru

Путем определения среднего показателя адгезии, коэффициента адгезии и индекса адгезии проведена оценка влияния субингибирующих концентраций наночастиц серебра и многостенных углеродных нанотрубок на адгезивную активность стандартных штаммов и клинических изолятов грамотрицательных бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*. Установлено, что совместное культивирование с металлическими наночастицами приводит к угнетению адгезивной активности микроорганизмов. Внесение многостенных углеродных нанотрубок в состав мясо-пептонного бульона способствует повышению адгезивных свойств всех исследованных бактерий. Увеличение адгезивной способности бактерий при совместном культивировании с многостенными углеродными нанотрубками открывает перспективы использования данных наноструктур для предварительного культивирования пробиотических штаммов с целью повышения их адгезивной активности.

Ключевые слова: грамотрицательные бактерии, адгезивная активность, наночастицы серебра, многостенные углеродные нанотрубки

EFFECT OF METAL AND CARBON NANOSTRUCTURES ON THE ADHESIVE PROPERTIES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Shapoval O.G.¹, Nechaeva O.V.¹, Shulgina T.A.², Puchinan D.M.², Shurshalova N.F.³

¹Saratov State Medical University n.a. V.I.Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, street B.Kazachya, 112), e-mail: ogshapoval@gmail.com;

Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Saratov, Russia (410002, Saratov, street Chernyshevsky, 148), e-mail: sarniito-nauka@yandex.ru;

Saratov State University n.a. N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, street Astrachanskya, 83), e-mail: francissella@rambler.ru

By determining the average adhesion coefficient of adhesion and adhesion index assessed the impact of subinhibitory concentrations of silver nanoparticles and multiwall carbon nanotubes on the adhesive activity of standard strains and clinical isolates of Gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. It has been established that co-culturing with metal nanoparticles leads to inhibition of adhesion activity of microorganisms. Adding multiwall carbon nanotubes in the meat-peptone broth enhances the adhesive properties of all investigated bacteria. Increased adhesiveness of bacteria in co-culture with multi-walled carbon nanotubes opens up prospects for use of these nanostructures prior cultivation of probiotic strains to improve their adhesion activity.

Keywords: Gram-adhesive activity, silver nanoparticles, multiwall carbon nanotubes

Адгезия бактерий представляет собой важнейший начальный этап взаимодействия с клетками макроорганизма. Адгезивными свойствами характеризуются как представители нормальной микрофлоры, так и патогенные микроорганизмы. Благодаря адгезии резидентная микрофлора реализует свойство колонизационной резистентности, тем самым препятствуя заселению биотопов посторонними микроорганизмами и создавая защитный барьер от инфекционных агентов [3, 4, 7]. Для патогенных бактерий адгезия является стартовым механизмом в формировании биопленок, в составе которых микробные клетки

характеризуются повышенной устойчивостью к эффекторам иммунной системы, антибиотикам и дезинфектантам [1, 5].

Молекулярные механизмы адгезии универсальны как для патогенных форм, так и для представителей нормофлоры, поскольку в их основе лежит лиганд-рецепторное узнавание [7, 13]. Лиганды и рецепторы являются полимерами гликолипидной или гликопротеиновой природы, которые состоят из множества копий уникальных субъединиц, что и определяет тропизм микроорганизмов к своим клеткам-мишеням [11].

Таким образом, одной из актуальных задач прикладной микробиологии является поиск препаратов, обеспечивающих изменение адгезивной активности бактерий с целью ее повышения для представителей нормальной микрофлоры или снижения для возбудителей инфекционных заболеваний.

Целью нашей работы явилось изучение влияния наноструктур на адгезивные свойства условно-патогенных грамотрицательных бактерий.

В качестве экспериментальной модели были использованы стандартные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Escherichia coli* 113-13, а также их клинические изоляты. Выбор микроорганизмов был связан с их ведущей ролью в возникновении гнойно-воспалительных заболеваний.

В работе были использованы коллоидный раствор наночастиц серебра кубической формы с размером граней 20 нм, предоставленный Институтом биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, а также многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ), длина которых составляла 0,5-1 мкм и диаметр 10-20 нм, полученные CVD-методом, предоставленные Саратовским филиалом Института радиоэлектроники им. В.А. Котельникова РАН.

Согласно литературным данным наночастицы серебра оказывают бактерицидное действие на микроорганизмы [12, 14, 15]. Поэтому с помощью метода двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (МПБ) была определена минимальная подавляющая концентрация (МПК) металлических наноструктур в отношении исследуемых бактерий [10].

Ранее нами было установлено, что многостенные углеродные нанотрубки не оказывают ингибирующего влияния на микробные клетки, а в случае с кишечной палочкой способствуют стимуляции роста [6].

Для изучения влияния исследуемых наноструктур на адгезивные свойства стандартных штаммов и клинических изолятов *P.aeruginosa* и *E.coli* взвесь микробных клеток инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C с добавлением субингибирующих концентраций наночастиц серебра (¼ МПК) или МУНТ в концентрации 1 мг/мл. В качестве контроля использовали суточные культуры исследуемых бактерий в МПБ без добавления

наноструктур. Микробная нагрузка составила 2×10^5 м.к./мл по стандарту мутности McFarland.

Адгезивную активность изучали экспресс-методом, предложенным В.И. Брилис и соавторами, на свежих эритроцитах O(I) Rh(+) (14). Для этого эритроциты трижды отмывали 0,1М раствором фосфатного буфера путем центрифугирования и готовили взвесь эритроцитов концентрацией 10^8 клеток/мл. На чистом обезжиренном предметном стекле суспензировали по одной бактериологической петле бульонной культуры каждого штамма и одной капле взвеси эритроцитов. После 30 минут инкубации при 37°C во влажной камере предметные стекла высушивали и фиксировали смесью Никифорова, после чего окрашивали водным фуксином. Адгезивную активность каждой опытной культуры микроорганизмов согласно методике оценивали с помощью иммерсионной микроскопии по трем показателям: среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту адгезии (КА) и индексу адгезии микроорганизма (ИАМ).

Для определения коэффициента адгезии (КА, %) из числа учитываемых эритроцитов подсчитывали процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности микроорганизмы. Средний показатель адгезии (СПА) определяли по среднему числу микроорганизмов, осевших на поверхности одного эритроцита, при подсчете не менее 25 эритроцитов.

Затем был подсчитан индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ), который представляет собой среднее количество микробных клеток на одном эритроците, участвующем в адгезивном процессе. Расчет ИАМ проводили по формуле:

$$ИАМ = \frac{СПА}{КА} \times 100\% ,$$

В зависимости от ИАМ все микроорганизмы можно разделить на 4 группы:

- неадгезивные, если ИАМ от 1,00 до 1,75;
- низкоадгезивные, если ИАМ от 1,76 до 2,49;
- среднеадгезивные, если ИАМ от 2,50 до 3,99;
- высокоадгезивные, если ИАМ > 4,00.

Статистическую обработку проводили согласно методике оценки существенности различий между найденными в опыте средними величинами [2].

В ходе проведенных исследований было установлено, что МПК наночастиц серебра для стандартного штамма и клинических изолятов *E.coli* составила 5 мкг/мл, для стандартного штамма *P.aeruginosa* ATCC 27853 – 80 мкг/мл, клинических изолятов *P.aeruginosa* № 2, № 4 – 5 мкг/мл, № 3 – 20 мкг/мл.

Результаты оценки ИАМ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Значения индекса адгезии микроорганизмов грамотрицательных бактерий
в зависимости от условий культивирования

Исследуемые микроорганизмы	Значения ИАМ		
	МПБ+наночастицы серебра (¼ МПК)	МПБ+МУНТ	МПБ (контроль)
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	2,92±0,89	4,82±0,28*	3,64±1,09
<i>P. aeruginosa</i> № 1	1,8±0,63*	6,44±0,46	5,95±1,21
<i>P. aeruginosa</i> № 2	1,16±0,37*	4,28±0,62*	2,32±0,73
<i>P.aeruginosa</i> № 3	2,4±0,8*	4,7±0,22*	3,28±1,11
<i>P.aeruginosa</i> № 4	1,21±0,41*	3,75±0,14*	2,92±0,56
<i>E.coli</i> 113-13	1,62±0,28*	2,8±0,38*	2,1±0,34
<i>E.coli</i> № 1	1,56±0,63*	7,96±0,8*	5,04±1,14
<i>E.coli</i> № 2	1,4±0,48*	8,2±1,32	6,88±0,81
<i>E.coli</i> № 3	1,44±0,49*	8,42±0,56	7,0±0,93
<i>E.coli</i> № 4	1,36±0,55*	8,28±0,46*	5,84±1,04

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю

Стандартный штамм *E.coli* согласно значениям ИАМ характеризовался низким уровнем адгезии, а все клинические изоляты кишечной палочки обладали высокой адгезивной активностью (значения ИАМ 5,04 – 7). Стандартный штамм *P.aeruginosa* ATCC 27853, а также клинические изоляты № 3 и № 4 по показателям ИАМ являлись среднеадгезивными, № 2 – низкоадгезивным, а клинический изолят № 1 – высокоадгезивным.

После культивирования микроорганизмов с добавлением субингибирующих концентраций наночастиц серебра было установлено значительное снижение адгезивной активности всех исследуемых бактерий по сравнению с контролем. Так, по показателям ИАМ стандартный штамм и все клинические изоляты *E.coli*, а также клинические изоляты *P.aeruginosa* № 2 и № 4 характеризовались как неадгезивные, клинические изоляты *P.aeruginosa* № 1, и № 3 как низкоадгезивные. Показатели ИАМ стандартного штамма *P.aeruginosa* ATCC 27853 достоверно не отличались от контрольных значений.

После культивирования микроорганизмов с добавлением МУНТ наблюдалось повышение значений ИАМ для всех исследуемых микроорганизмов. Так, согласно полученным результатам, наблюдалось изменение адгезивной активности с низкоадгезивного уровня для клинического изолята *P.aeruginosa* № 2 и со среднеадгезивного уровня для стандартного штамма *P.aeruginosa* ATCC 27853 и клинических изолятов № 3 и № 4 до высокоадгезивного уровня. Показатели ИАМ для *P.aeruginosa* №1 достоверно не отличались от контрольных значений.

При совместном культивировании стандартного штамма кишечной палочки и углеродных наноструктур наблюдалось повышение значений ИАМ, что способствовало

повышению уровня адгезии с низкоадгезивного до среднеадгезивного. Хотя клинические изоляты *E.coli* характеризовались как высокоадгезивные, однако значения ИАМ были выше контрольных и достоверно отличались для клинических изолятов № 1 и № 4.

Таким образом, воздействие субингибирующих концентраций наночастиц серебра на стандартные штаммы и клинические изоляты *P.aeruginosa* и *E.coli* приводят к снижению адгезивной активности грамотрицательных бактерий. Это связано с деструктивным действием наночастиц серебра в отношении фимбриальных структур бактерий, обеспечивающих адгезию. Неметаллические наноструктуры, в частности многостенные углеродные нанотрубки, наоборот, способствуют повышению адгезивной активности грамотрицательных бактерий, что, вероятно, вызвано особенностями их взаимодействия с поверхностными структурами клеточной стенки.

Заключение

Воздействие субингибирующих концентраций наночастиц серебра ($\frac{1}{4}$ МПК) приводит к угнетению адгезивной активности стандартных штаммов и клинических изолятов грамотрицательных бактерий *P.aeruginosa* и *E.coli*. Это позволяет рассматривать перспективы использования препаратов, содержащих металлические наноструктуры, для местного лечения и профилактики заболеваний, вызванных чувствительными микроорганизмами. Увеличение адгезивной способности бактерий при совместном культивировании с многостенными углеродными нанотрубками открывает перспективы использования данных наноструктур для предварительного культивирования пробиотических штаммов с целью повышения их адгезивной активности.

Список литературы

1. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 51-58.
2. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
3. Бондаренко В. М., Рябиченко Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. - № 1. – С. 92-100.
4. Бухарин О. В. Инфекция – модельная система ассоциативного симбиоза // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. - № 1. – С. 83-86.

5. Голуб А. В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 23-29.
6. Изучение влияния углеродных нанотрубок на водную и биологические среды / О.В. Нечаева, Г.В. Торгашев, О.Е. Глухова [и др.] // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2009. - № 9. – С. 59-63.
7. Костюкова Н. Н. Начальный этап инфекционного процесса – колонизация и пути ее предотвращения // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. – 1989. - № 9. – С. 103-110.
8. Кушнарера М. В. Влияние нетилмицина, амикацина, цефтазидима и цефотаксима на адгезивные свойства микроорганизмов, выделенных у новорожденных детей // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. м Т. 45, № 7. – С. 17-21 .
9. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис, Т. А. Брилене, Х. П. Ленцнер, А. А. Ленцнер // Лабораторное дело. – 1986. - № 4. – С. 210-212.
10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // МУК 4.2.1890 – 04. – М.: Издательский отдел Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004. – 91 с.
11. Петровская В. Г., Бондаренко В. М. Влияние катионных белков клеток крови человека на рост *Escherichia coli* // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. – 1990. - № 5. – С. 110-117.
12. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J.S. Kim DVM, Ph. Da, E. Kuk MSb [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 3, Is. 1. – P. 95-101.
13. Molecular approach for the study of uropathogenesis / Schoolnik [et al.] // Bacteria-HostCell Interaction. – 1987. – P. 201-211.
14. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria // Journal of colloid and interface science. – 2004. – Vol. 275, № 1. – P. 177-182.
15. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient / K. Cho, J. Park, T. Osaka, S. Park // Electrochimica acta. – 2005. - № 51. – P. 956-960.

Рецензенты:

Карпунина Л.В., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии, ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», г. Саратов;

Тихомирова Е.И., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой экологии, ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», г. Саратов.