

ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ

Д. А. Банникова¹, А. Б. Кононенко¹, А. В. Лобанов^{2*}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии», Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, *e-mail: avlobanov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2017 г.

Методом сканирующей электронной микроскопии выявлены морфологические изменения, происходящие в бактериальных популяциях под воздействием наночастиц серебра и фталоцианината марганца. В качестве тест-культур были использованы штаммы *E. coli*, *S. aureus* и *S. enteritidis*. Показано, что бактерицидный эффект металлических и металлокомплексных наночастиц зависит от их концентрации в препарате. Чем выше концентрация наночастиц, тем глубже поражение клеточных структур и более выражен дезинфицирующий эффект применяемого препарата. Показано, что метод сканирующей электронной микроскопии дает возможность оценить действие препарата не на отдельную бактериальную клетку, а на бактерии, организованные в микроколонии и колонии. Уникальные свойства наноматериалов и их биологическая активность могут быть использованы для создания нового класса антибактериальных средств.

Ключевые слова: наночастицы серебра, металлокомплексы фталоцианинов, сканирующая электронная микроскопия, морфология бактериальной популяции.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ механизма действия дезинфицирующих средств является необходимым условием при разработке и усовершенствовании новых препаратов и режимов дезинфекции. Устойчивость патогенных бактерий к воздействию дезинфектантов зависит от особенностей используемого химического вещества, его концентрации, продолжительности воздействия.

Из числа эффективных малотоксичных дезинфицирующих средств значительный интерес представляют препараты нового поколения, основанные на использовании металлических наночастиц [1-6]. Это обусловлено специфическими свойствами как самих наночастиц, так и модифицированных ими материалов. Многообещающие перспективы открываются и для применения наночастиц металлов в биологии и медицине, вследствие чего возникло новое направление экспериментальной медицины, получившее название «Наномедицина» [7, 8]. Показано, например, что наночастицы серебра могут быть использованы для получения различных материалов с бактерицидными свойствами, так как, благодаря малому размеру, они

чрезвычайно активны, имеют большую удельную поверхность, что увеличивает область контакта с микроорганизмами [9-15].

Среди бактериостатиков давно известны некоторые красители, например, метиленовый синий, толуидиновый синий и многие другие. Установлен широкий спектр их антимикробного действия, но применение красителей имеет и ряд недостатков. Это, прежде всего, необходимость использования высоких концентраций красителей для проявления их эффективности и образование микроорганизмов с повышенным уровнем экспрессии белков-помп, обуславливающих множественную лекарственную резистентность. На сегодняшний день внимание исследователей обращено на металлокомплексные красители класса металлофталоцианинов, обладающих широким спектром антимикробной активности. Как и наносеребро, красители на основе фталоцианинов перспективны при создании новых дезинфицирующих средств. Фталоцианины – гетероциклические соединения, содержащие сопряженное кольцо тетраазатетрабензопорфина, структурно родственные порфиринам (рис. 1). Они широко используются не только как красители, но и как молекулярные полупроводники в различных устройствах микроэлектроники, материалы для жидко-кристаллических дисплеев, катализаторы. Для медицинского использования существенным свойством фталоцианинов оказалась их эффективность для фотодинамической инактивации клеток [16, 17].

Исследование свойств металлических и металлокомплексных наночастиц показало их ранозаживляющую активность, регенерирующие и бактерицидные свойства [18, 19]. Биологически активные наночастицы металлов обладают пролонгированным действием из-за наличия на их поверхности защитного оксидного или гидроксидного слоя, предотвращающего быстрое растворение металла-основы [20-22]. Биологическая активность наночастиц и наноматериалов может быть использована для создания нового класса антибактериальных средств [23-25]. В настоящей работе рассмотрено бактерицидное действие наночастиц серебра и марганцевого комплекса фталоцианина, исходя из анализа морфологических изменений популяций болезнетворных бактерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве тест-культур в работе использовали *Escherichia coli*, штамм 1257, *Staphylococcus aureus*, штамм P209, *Salmonella enteritidis* 11/12. Антимикробные препараты представляли собой растворы наночастиц фталоцианината марганца(II) (рис. 1) и коллоидного серебра, стабилизированные поливинилпирролидоном (2% масс.), полученные по методикам [26, 27]. Растворы наносеребра имели различную концентрацию – от 2 до 40 мг/л и размер 60 нм. Исходная концентрация фталоцианина составляла 36 мг/л, размер наночастиц - 20 нм.

Изучение бактерицидного и бактериостатического действия наночастиц фталоцианина и серебра на морфологию и развитие популяций клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии.

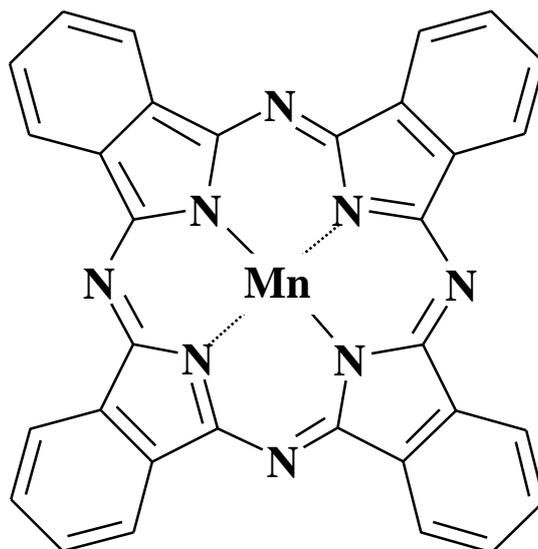


Рис. 1. Структурная формула фталоцианината марганца.

Мембранные фильтры с диаметром пор 0,15-0,25 мкм смачивали изучаемыми растворами. Фильтры помещали на слой мясо-пептонного агара в чашки Петри и наносили на их поверхность каплю взвеси клеток суточных тест-культур в концентрации 10^4 м.к./мл. Чашки инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C . Контролем служили посевы бактериальной взвеси на мембранные фильтры, смоченные физиологическим раствором. После инкубации мембранные фильтры снимали с поверхности питательной среды, просушивали и фиксировали в парах 25%-го глутарового альдегида в течение суток. Затем небольшие участки фильтров с колониями бактерий наклеивали на специально подготовленные медные пластины и обезживали в парах пропиленоксида. На подготовленные таким образом образцы напыляли золото на установке «Hitachi-102» в течение 20 мин и исследовали на электронном микроскопе «Hitachi-800» со сканирующей приставкой при ускоряющем напряжении 75 кВ и инструментальном увеличении 1-30000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом сканирующей электронной микроскопии была изучена морфология популяций стафилококка и кишечной палочки при воздействии растворов фталоцианината марганца и популяция клеток сальмонелл при воздействии растворов наносеребра в различных дозах, вызывающих бактериостатический и бактерицидный эффекты. В экспериментах осуществляли наблюдение за динамикой развития популяций бактерий на обработанных изучаемыми растворами поверхностях мембранных фильтров. Щадящие способы фиксации и обезживания препаратов позволили сохранить естественную архитектуру бактериальной популяции в развитии (рис. 2).

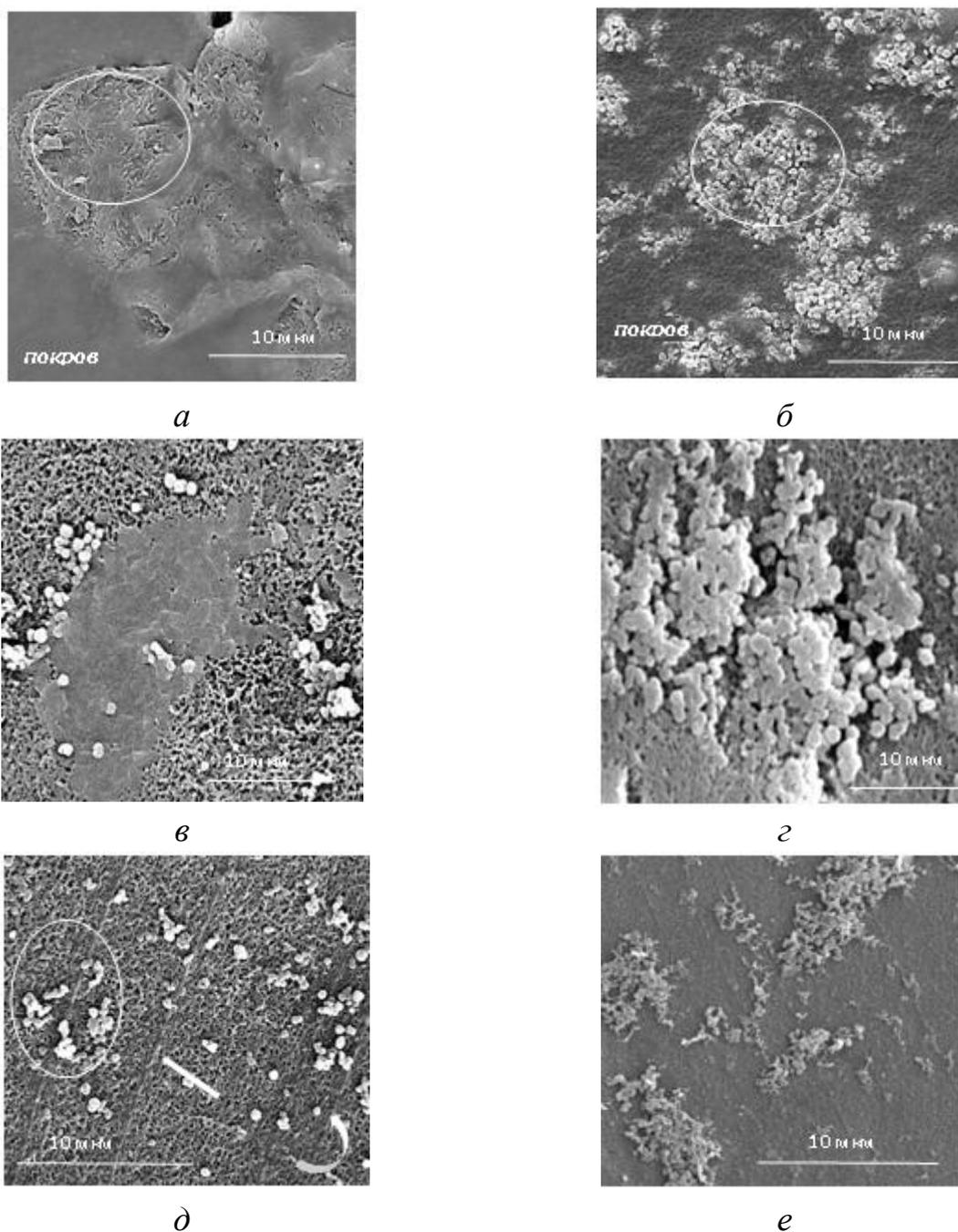


Рис. 2. Фрагменты популяций *E. coli* (а) и *S. aureus* (б) в контроле: культуры находятся в S-форме, о чем свидетельствует образование массивного покрова, продуцируемого полноценной клеточной стенкой; под покровом отчетливо просматриваются типичные клетки. Фрагменты популяций *E. coli* (в) и *S. aureus* (з), обработанных раствором фталоцианината марганца (1,8 мг/л): наружный покров отсутствует, на периферии заметно образование клеток сферопластного и протопластного типа. Фрагменты популяций *E. coli* (д) и *S. aureus* (е), обработанных раствором фталоцианината марганца (36 мг/л): клеток типичной морфологии не выявлено; заметны скопления клеток сферопластного и протопластного типа (обведены), образование нитчатых структур (показаны стрелками), мелких клеток L-форм (показаны фигурной стрелкой).

В контрольных образцах колонии тест-культур находились в S-форме и представляли собой популяции клеток, закрытых плотным покровом (био пленкой). В отдельных участках заметно нарушение его целостности, что позволило наблюдать типичные для тест-культур делящиеся клетки (рис. 2, а и б).

На поверхностях фильтров, обработанных растворами фталоцианината марганца с концентрацией 1,8 мг/л, в популяциях клеток стафилококка и кишечной палочки происходило практически полное разрушение покровов и образование клеток сферопластного и протопластного типов (рис. 2, в и г). При дальнейшем культивировании на поверхностях мембранных фильтров был отмечен нетипичный рост тест-культур, что проявлялось в ослаблении пигментации и появлении колоний слизистой консистенции.

На поверхностях фильтров, обработанных растворами фталоцианината марганца с концентрацией 36 мг/л, рост тест-культур не наблюдался. Несмотря на это, методом сканирующей электронной микроскопии были выявлены клетки гетероморфного типа на различных стадиях L-трансформации. Характерной картиной в этих экспериментах было появление в популяциях тест-культур нитевидных структур, а также в отдельных участках можно было наблюдать образование мелких округлых клеток L-форм (рис. 2, д и е).

Таким же образом была изучена морфология популяций сальмонелл при воздействии растворов наносеребра в различных дозах, вызывающих бактериостатический и бактерицидный эффекты.

В контрольных образцах колонии сальмонелл представляли собой популяции палочковидных клеток, объединенных межклеточным матриксом и закрытые с поверхности плотным покровом (рис. 3, а). На поверхностях, обработанных растворами наносеребра с концентрацией 2 мг/л, в популяции клеток сальмонелл происходило частичное разрушение наружного покрова и межклеточного матрикса между отдельными бактериальными клетками, и, как следствие, нарушение пространственной ориентации клеток (рис. 3, б). К каким-либо более серьезным разрушениям данная концентрация серебра не приводила, и на поверхности мембранного фильтра отмечали рост культуры сальмонелл. Дальнейшее культивирование таких популяций на свежих питательных средах приводило к развитию типичных колоний *S. enteritidis*.

На поверхностях, обработанных растворами наносеребра с концентрацией 4 мг/л, в популяциях сальмонелл развивались клетки гетероморфного типа. Было отмечено образование округлых клеток разной величины – сферопластов (рис. 3, в). Обратимость данных процессов в популяции была доказана появлением типичного роста культур сальмонелл в результате последующего культивирования на свежих питательных средах. Сканирующая электронная микроскопия таких культур выявила образование мощных скоплений реверсирующих клеток, имеющих типичное извитое строение. На отдельных участках было зафиксировано начальное образование наружного покрова – био пленки, продуцируемой только клетками, имеющими полноценную клеточную стенку (рис. 3, г).

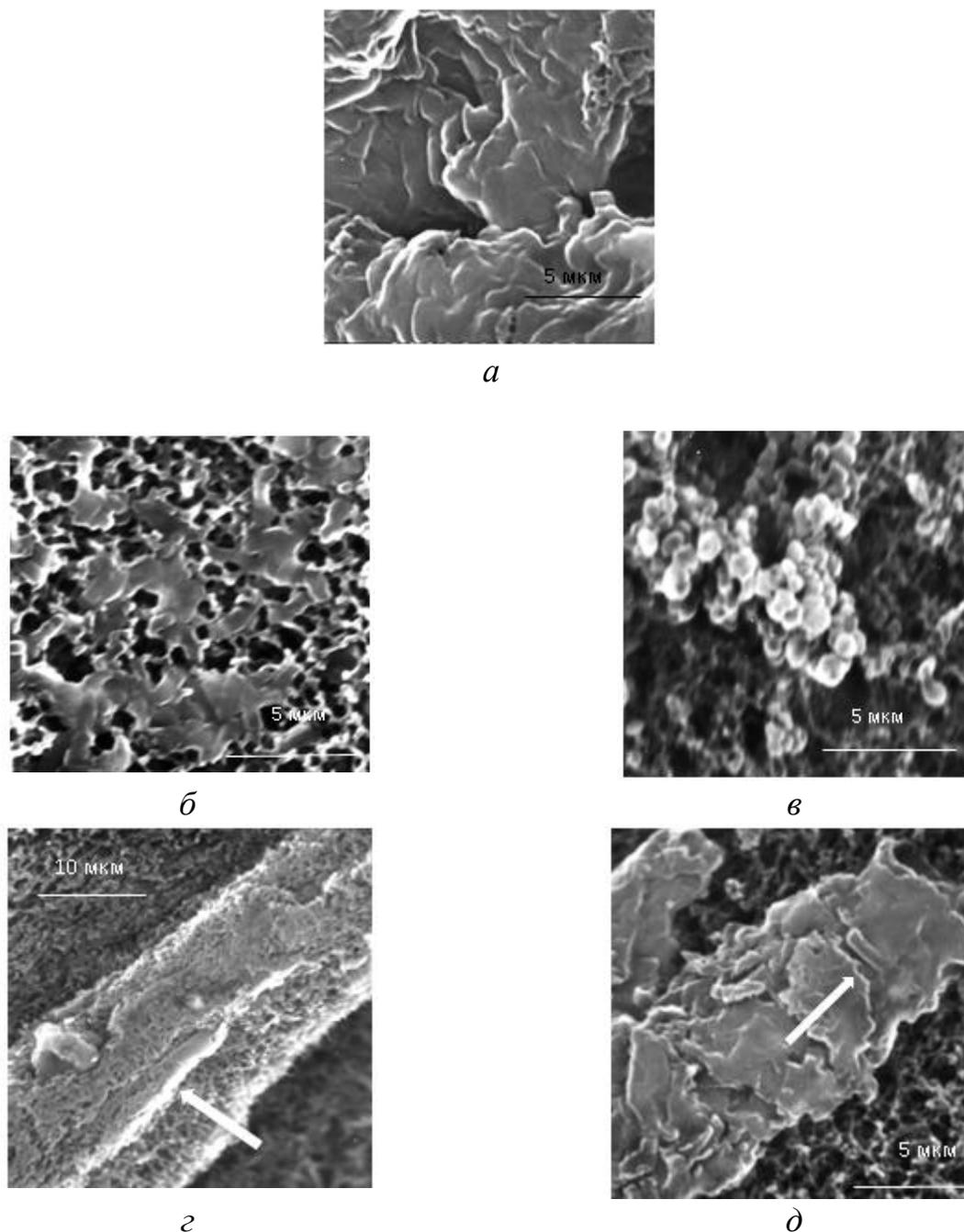


Рис. 3. Фрагмент популяции *S. enteritidis* в контроле (а): клетки палочковидной формы плотно сгруппированы в микроколонию, снаружи закрыты покровами. Фрагмент популяции *S. enteritidis* после воздействия бактериостатических доз растворов наносеребра (2 мг/л): наружный покров и межклеточный матрикс частично разрушены, клетки палочковидной формы дезориентированы в пространстве (б). Фрагмент популяции *S. enteritidis* после воздействия бактериостатических доз наносеребра (4 мг/л): клеток палочковидной формы не выявлено; заметно образование клеток сферопластного типа (в). Реверсия в популяции *S. enteritidis* (г): видны массивные скопления извитых клеток-ревертантов, заметно начальное образование покрова (показано стрелкой). Фрагмент популяции *S. enteritidis* на поверхности мембранных фильтров, обработанных бактерицидными дозами растворов наносеребра (д): популяция представлена типичными микроколониями (показано стрелкой).

Воздействие растворов наносеребра с концентрацией 40 мг/л вызывало необратимую гибель популяции сальмонелл. Отсутствие роста культуры при дальнейшем культивировании на свежих питательных средах, как агаризованных, так и бульонных, свидетельствовало о невозможности популяции к реверсии. Обращает на себя внимание тот факт, что на сканограммах при этом отчетливо заметны типичные бактериальные микроколонии, представленные палочковидными клетками под покровами (рис. 3, д). Очевидно, что, попав на обработанные бактерицидными дозами растворов наносеребра поверхности, микроколонии мгновенно погибают, сохраняя при этом нативную морфологию.

Таким образом, методом сканирующей электронной микроскопии показано, что наночастицы серебра в концентрациях 2-4 мг/л частично разрушают клеточную стенку бактерий, препятствуют нормальному делению клеток и инициируют процессы гетероморфизма, что приводит к образованию в популяциях клеток сферопластного и протопластного типа. При этом популяция остается жизнеспособной, хотя ее развитие несколько замедляется. Попав в благоприятную среду, такие популяции полностью восстанавливают свои морфологические свойства и возможность роста и развития в среде обитания. Иными словами, в данном случае наблюдается бактериостатический эффект.

Концентрация наночастиц фталоцианинов 36 мг/л обеспечивает образование в популяциях бактерий стабильных L-форм. Обработанные таким образом популяции не дают вторичного роста на питательных средах.

Высокие концентрации наносеребра (40 мг/л) вызывают столь стремительную гибель клеток в популяции, что возможности сканирующей электронной микроскопии не позволяют зафиксировать происходящие морфологические изменения в популяции в виде разрушения покровов, мембранных структур или возникновения гетероморфных форм.

Таким образом, бактерицидный эффект исследованных наночастиц напрямую зависит от их концентрации. Чем выше концентрация, тем глубже поражение клеточных структур и тем более выражен дезинфицирующий эффект применяемого препарата. Полученные данные следует учитывать при создании композиционных препаратов на основе наночастиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом сканирующей электронной микроскопии изучены морфологические изменения, происходящие в бактериальной популяции под воздействием наночастиц серебра и фталоцианината марганца. Использование данного метода дает уникальную возможность оценить действие препарата не на отдельную бактериальную клетку, а на бактерии, организованные в микроколонии и колонии. Препараты на основе металлических и металлокомплексных наночастиц в зависимости от концентрации проявляют как бактериостатический, так и бактерицидный эффект. Наночастицы и материалы на их основе могут быть использованы для создания новых классов антибактериальных средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 15-03-03591.

Список литературы:

1. *Егорова Е.М.* // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Нанотехнологии – производству 2005». Москва, Фрязино, 2005. С. 26.
2. *Егорова Е.М., Носик Д.Н., Носик Н.Н., Калнина Н.Б.* // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Нанотехнологии – производству 2005». Москва, Фрязино, 2005. С. 46.
3. *Кульский Л.А.* Серебряная вода. Киев: Освита, 1977.
4. *Мосин О.В.* Продукт нанотехнологии – коллоидное серебро. Москва: МГА тонкой хим. технологии им. М.В. Ломоносова, 2013.
5. *Костылева Р.Н., Бурмистров В.А.* // Сборник тезисов научно-практической конференции «Серебро и висмут в медицине». Новосибирск, 2005. С. 53.
6. *Погорельский И.П., Фролов Г.А., Гурин К.И., Лундовских И.А., Леценко Е.А., Дурнев Е.А., Менухова В.С., Смирнов Г.Г.* // Дезинфекционное дело. 2014. № 2. С. 35.
7. *Благитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П., Михайлов Ю.И., Родионов П.П.* Серебро в медицине. Новосибирск: Наука-Центр, 2004.
8. *Баранова Е.К., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Ревина А.А., Эль-Регистан Г.И.* // Научно-технические технологии. 2005. Т. 6. № 5. С. 33.
9. *Кудрявцев Б.Б., Недачин А.Е., Данилов А.Н., Оводенко Н.И., Ревина А.А., Егорова Е.М.* // Лакокрасочные материалы и их применение. 2001. № 2-3. С. 3.
10. *Пашиковская А.А., Котова Е.А., Дурантини Э.Н., Антоненко Ю.Н.* // Сборник тезисов IV Съезда фотобиологов России. Саратов, 2005. С. 155.
11. *Риткер П.* // Новости медицины. 1999. Т. 4. № 15. С. 12.
12. *Одегова Г.В., Бурмистров В.А., Родионов П.П.* // Сборник тезисов конференции «Новые химические системы и процессы в медицине». Новосибирск, 2004. С. 58.
13. *Chen D., Xi T., Bai J.* // Biomed. Mater. 2007. V. 3. No. 2. P. 126.
14. *Soni I., Salopek-Bondi B.* // J. Colloid Interface Sci. 2004. V. 27. P. 70.
15. *Woraz K.* // Toxicology. 2001. No. 12. P. 89.
16. *Ударцева О.О., Лобанов А.В., Андреева Е.Р., Дмитриева Г.С., Мельников М.Я., Буравкова Л.Б.* // Биофизика. 2014. Т. 59. № 6. С. 1051.
17. *Ударцева О.О., Лобанов А.В., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Мельников М.Я.* // Изв. АН. Сер. хим. 2016. № 1. С. 277.
18. *Alt V., Bechert T., Steinrücke P.* // Biomaterials. 2004. V. 25. No. 18. P. 4383.
19. *Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.* Toxicological Sciences. 2005. 88. No. 2. P. 412.
20. *Melaiye A., Sun Z., Hindi K.* // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. No. 7. P. 2285.
21. *Shahverdy A.R., Fakhimi A., Minaian S.* // Nanomedicine-Nanotechnology biology and medicine. 2007. V. 3. No. 2. P. 168.
22. *Jang W., Kim B.Y., Rutka J.T.* // Nature Nanotechnol. 2008. V. 3. No. 3. P. 145.
23. *Кононенко А.Б., Банникова Д.А., Бритова С.В., Савинова Е.П., Стрелков А.А., Светличкин О.В., Набиуллина Д.Н., Лобанов А.В.* // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2015. № 3 (15). С. 46.
24. *Кононенко А.Б., Банникова Д.А., Бритова С.В., Светличкин О.В., Лобанов А.В.* // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2014. № 2 (12). С. 41.
25. *Погорельский И.П., Фролов Г.А., Гурин К.И., Чернядьев А.В., Дурнев Е.А., Лундовских И.А., Янов С.Н., Кунгуров А.В.* // Дезинфекционное дело. 2012. № 4. С. 37.
26. *Лобанов А.В., Васильев С.М., Кононенко А.Б., Банникова Д.А., Бритова С.В., Савинова Е.П., Горшенев В.Н., Заиков Г.Е., Варфоломеев С.Д.* // Вестн. Каз. технол. ун-та. 2015. Т. 18. № 2. С. 111.

INFLUENCE OF METALLIC AND METALL COMPLEX NANOPARTICLES ON BACTERIAL POPULATIONS

D. A. Bannikova, A. B. Kononenko, and A. V. Lobanov^{1}*

All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology, Moscow, Russia

¹Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,

*e-mail: avlobanov@mail.ru

Received October 20, 2017

Abstract – The method of scanning electron microscopy was proved to be useful in revealing a series of morphological changes occurring in bacterial populations under the influence of silver nanoparticles and manganese phthalocyanine. The strains of *E. coli*, *S. aureus* and *S. enteritidis* were used as test cultures. Bactericidal effect of metal and metal complex nanoparticles was shown to depend on their concentration in the preparation. The higher was the concentration of nanoparticles, the deeper was the damage of cellular structures and the more pronounced was the disinfecting effect of the drug developed. It was shown that the method of scanning electron microscopy provided an opportunity to evaluate the effect of the preparation not just on a separate bacterial cell, but on bacteria organized in colonies and micro-colonies, in whole. Unique properties of nanomaterials combined with their biological activity can be applied for creating a new class of antibacterial agents.

Keywords: silver nanoparticles, metallocomplexes of phthalocyanines, scanning electron microscopy, morphology of bacterial population.