

Гаврилова И.А. Атомно-силовая микроскопия морфоструктурных изменений *Pseudomonas aeruginosa*, подвергшихся воздействию биоцида на основе алкилдиметилбензиламмония хлорида и полигексаметиленгуанидина // И.А. Гаврилова, Г.К. Жавнерко, Л.П. Титов // Доклады Национальной академии наук Беларуси – 2013 – выпуск 5 (Том 57). – с. 81-87.

УДК 615.281.9:579.23, 616: 579.61

И.А. ГАВРИЛОВА, Г.К. ЖАВНЕРКО, Л.П. ТИТОВ

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ МОРФОСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ БИОЦИДА
НА ОСНОВЕ АЛКИЛДИМЕТИЛБЕНЗИЛАММОНИЯ ХЛОРИДА И
ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА**

¹ – ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»

² – ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»

Pseudomonas aeruginosa – условно-патогенный микроорганизм приобретший важное значение в качестве этиологического агента внутрибольничных инфекций. Устойчивые к антибиотикам и другим антимикробным препаратам, включая дезинфектанты, формы этих бактерий занимают второе место среди грамотрицательных микроорганизмов по частоте выделения от пациентов с данными инфекциями [1,2]. Основным способом предотвращения возникновения и распространения внутрибольничных инфекций является проведение адекватных дезинфекционных мероприятий с использованием дезинфицирующих средств (ДС), вызывающих быструю гибель микробов на объектах внешней среды [3-5].

Несмотря на многообразие средств химической дезинфекции, количество активно действующих веществ (АДВ), входящих в их состав весьма ограничено. В состав ДС входят такие действующие агенты как альдегиды, спирты, четвертичные аммониевые соединения, третичные амины, галогены, перекисные соединения, фенолы, кислоты [6]. Изыскание новых АДВ, равно как и создание ДС, сдерживается недостаточной изученностью механизмов действия на микробную клетку [7,8].

Существующие методы исследования биологической эффективности воздействия ДС на популяцию бактерий не представляют информации о механизмах формирования устойчивости, выживании в условиях воздействия сниженных (суббиоцидных) концентраций и/или несоблюдении требуемой экспозиции, равно как и о морфоструктурных и геномических адаптационных процессах выживших бактерий, признаках «дезрезистентности» популяции бактерий, их кооперации и формировании биопленок [9].

Понимание механизмов действия ДС на бактерии требует новых знаний об их структурной организации и физических свойствах, как при физиологических состояниях, так и при воздействии неблагоприятных факторов. Исследование этих механизмов методами световой микроскопии затруднено вследствие малых размеров клеток бактерий и низкой разрешающей способностью световых микроскопов.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является инновационной технологией, основанной на оценке взаимодействия биологических сил между структурами образца и острой иглой прибора позволяющей визуально качественно и количественно описать топографические особенности исследуемой поверхности в нанометровой шкале. В последние годы возросло число исследований с использованием АСМ в микробиологических исследованиях, и особенно по изучению поверхностных структур бактериальных клеток. Данная технология позволяет изучить процессы, происходящие на поверхности микробов (экспрессию биомолекул, вывлечение пор в клеточной стенке, адгезивные свойства, упругость и шероховатость) при различных условиях, а также оценить и описать изменение морфоструктурных характеристик бактериальных клеток в целом [10]. Новая количественная и качественная информация (трехмерное изображение ультраструктуры поверхности) с молекулярным разрешением в реальном времени и с минимальным количеством анализируемых проб, получаемая

методом АСМ, весьма полезна для исследования биологических эффектов АДВ простых и композиционных ДС [11].

Цель работы: выявить и охарактеризовать морфоструктурные изменения клеток *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии дезинфицирующего средства на основе четвертичных аммониевых соединений (алкилдиметилбензиламмония хлорида) и полигексаметиленгуанидина хлорида в рабочей и суббиоцидных концентрациях методом атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы. Основные этапы постановки опыта по воздействию биоцида представлены на рисунке 1 (нумерация в круглых скобках соответствует номеру этапа на схеме, см. Рис.1).

Объектом исследования явилась типовая культура *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15412, обладавшая чувствительностью к изучаемому дезинфектанту. Оценка чувствительности к ДС осуществлялась качественным суспензионным методом [12]. На суточную культуру (1) тест-микроорганизма воздействовали композиционным дезинфицирующим препаратом на основе алкилдиметилбензиламмония хлорида (5,5%) и полигексаметиленгуанидина хлорида (2,5%) в рабочей и «шаговых» двукратных разведениях рабочей концентрации: $1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16$ (этапы 2-4). Контрольный образец ресуспензировали в том же объёме стерильной водопроводной воды. Бактерии многократно отмывали в стерильной дистиллированной воде и физиологическом растворе (0,85% NaCl) с последующим осаждением клеток центрифугированием (этапы 5-6). Готовили препараты бактерий для атомно-силовой микроскопии (АСМ), в качестве подложки использовали покровные стекла размером 5x5 мм (этапы 7-8).

Приготовленные образцы бактерий исследовались методом атомно-силовой микроскопии (9) в контактном режиме на воздухе на микроскопе Veeco («Nanoscope 3D», США). Использовались контактные кантилеверы CSC38 (константы жесткости 0,36 Н/м). Анализ и обработка изображений

проводились с использованием функций Particle analysis, Section analysis, Roughness специализированной программы обработки АСМ-изображений Nanoscope 5.31r1, построение трехмерных изображений бактериальных клеток осуществлялось в программе ФемтоСкан Онлайн (версия 2.3.219 (5.1)). Оценивали морфологические параметры клеток бактерий (длину, ширину, высоту) и физические свойства поверхности клеток тест-бактерии (шероховатость и структурированность) при воздействии дезинфектанта в рабочей и субоптимальных концентрациях в трех сериях опытов. Изменения морфометрических характеристик бактериальных клеток после воздействия биоцида в различных концентрациях оценены минимум на 56 клетках синегнойной палочки (воздействие $1/8$ рабочей концентрации), максимум на 108 клетках бактерий-объектов исследования (контрольный образец, не подвергшийся действию ДС).

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием пакета программ STATISTICA 6.1. Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Достоверность различий между статистическими параметрами определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

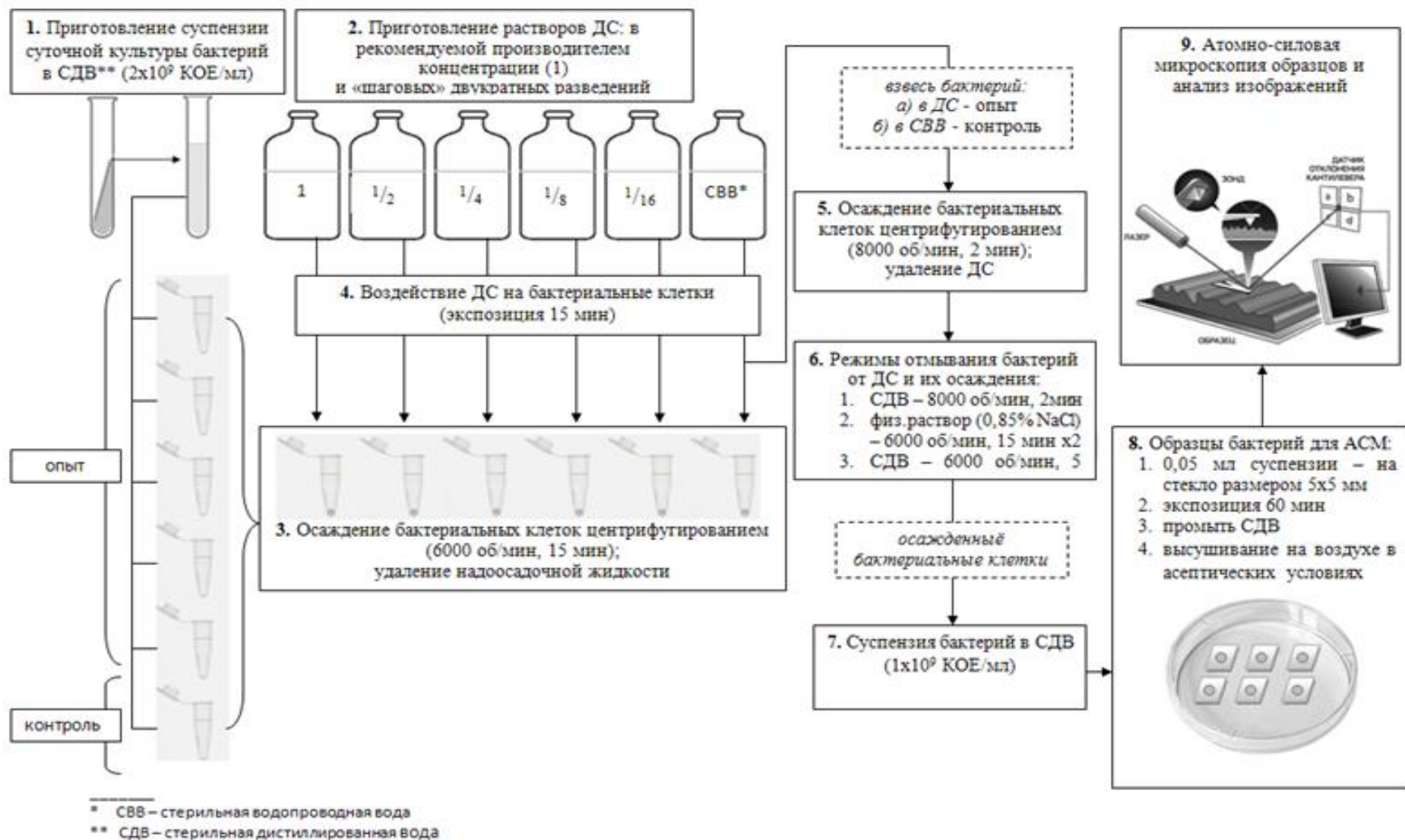


Рисунок 1 – Схема постановки опыта по воздействию биоцида на бактерии и подготовка клеток к исследованию с помощью АСМ

Результаты и их обсуждение.

Клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана бактерий являются первыми барьерами на пути химического антимикробного агента. Действие четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) обусловлено взаимодействием молекул активно действующего вещества (АДВ) с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, за которым следует ее дезорганизация и последующий лизис бактериальной клетки. Однако для грамотрицательных бактерий характерно наличие естественной устойчивости к дезинфицирующим средствам на основе ЧАС, вследствие непроницаемости клеточной стенки для молекул АДВ. Среди грамотрицательных бактерий наибольшей резистентностью обладает *P.aeruginosa*. Это обусловлено повышенным содержанием ионов магния в клеточной стенке псевдомонад, что способствует созданию сильных связей между молекулами липополисахаридов, кроме того, малые размеры пор не позволяют осуществлять диффузию молекул ЧАС через клеточную стенку. В связи с этим, в медицинских учреждениях любого уровня и профиля широко используются композиционные дезинфектанты на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) и полигексаметиленгуанидина (ПГМГ), которые обладают достаточной эффективностью в предупреждении возникновения и развития внутрибольничных инфекций при их правильном применении [13,14]. ЧАС усиливает способность гуанидина связываться с поверхностью клетки и увеличивает диффузию ПГМГ через клеточную стенку, чем достигается доставка молекулы дезинфектанта к цитоплазматической мембране, биоцид связывается с белковыми и фосфолипидными молекулами мембраны, вызывает её дестабилизацию, нарушение барьерных и транспортных функций и деструкцию [8,15]. Субоптимальные концентрации катионных поверхностно активных веществ (ЧАС и ПГМГ) вызывают менее глубокие изменения в структуре макромолекул цитоплазматической мембраны. Основной мишенью действия сублетальных концентраций ПГМГ по-видимому являются нуклеиновые

кислоты микроорганизма. Исследователи *Allen et al.* показали в экспериментах *in vitro* способность молекул ПГМГ связываться с ДНК и тРНК с осаждением ассоциированного комплекса нуклеиновой кислоты и соли гуанидина. Предполагается, что при воздействии низких концентраций ПГМГ, ущерб, причиненный ДНК незначителен и возможна репарация генома [16], при этом, вероятно, возможна перестройка генетической и метаболической программ, реорганизации поверхностных структур бактериальной клетки с целью обеспечения выживания в неблагоприятных условиях [17].

Оценка изменений морфопараметрических характеристик бактериальных клеток под влиянием различных концентраций биоцида с помощью атомно-силовой микроскопии.

Использование атомно-силовой микроскопии позволило визуализировать и оценить морфологию и структурные особенности поверхности бактерий, изучить изменения этих параметров при действии биоцида в разных концентрациях. Морфология отдельных бактерий, не подвергшихся действию ДС (контрольный образец), соответствовала типичной морфологии *Pseudomonas aeruginosa* – вытянутые палочковидные бактериальные клетки средних размеров (рисунок 2А). При воздействии дезинфектанта в рабочей концентрации клетки бактериальные клетки выглядели поврежденными, с сильно структурированной поверхностью, вокруг отдельных клеток и их скоплений регистрировались образования в виде глобул, являющиеся, очевидно, бактериальным детритом (рисунок 2В). Интенсивность выявляемых АСМ структурных повреждений бактерий в опытных образцах снижалась пропорционально снижению концентрации биоцида. Истечения клеточного содержимого во внешнюю среду после воздействия ДС в разведении $1/4$ от рабочей концентрации не было выявлено. Примечательно, что в этом же образце были обнаружены бактерии, окруженные капсульным веществом (рисунок 2Б). После воздействия $1/16$ рабочей концентрации ДС бактерии внешне не проявляли характерных

признаков антимикробного эффекта дезинфектанта – клетки располагались поодиночке, имели характерную удлиненную палочковидную форму, а поверхность клеток не демонстрировала наличие следов повреждений.

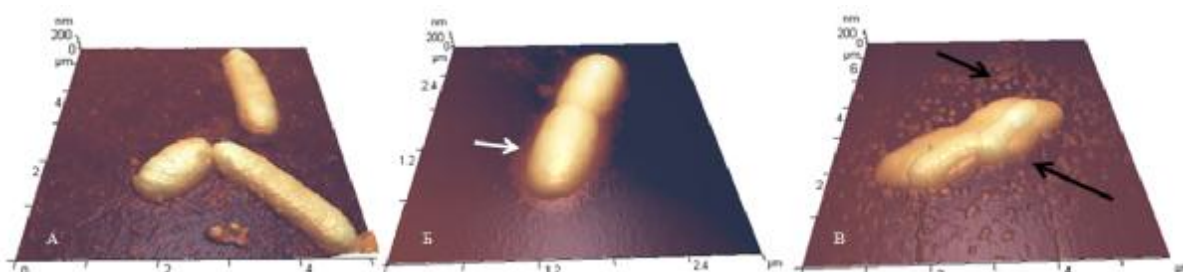


Рисунок 2 – Трехмерные модели бактериальных клеток

А – не подвергшихся действию дезинфектанта;

Б – после действия дезинфицирующего средства в суббиоцидной концентрации - $\frac{1}{4}$ (вокруг бактерий визуализируется капсульное вещество, указано стрелкой);

В – после воздействия дезинфектанта в рабочей концентрации (поверхностные слои структурированы, стрелками указаны компоненты разрушенных бактериальных клеток)

При детальной оценке действия ДС в рабочей концентрации на бактериальные клетки и характеристике структурированности их поверхности путем построения профилей поперечного сечения клеток были обнаружены участки тела бактериальных клеток, лишенные клеточного содержимого (рисунок 3).

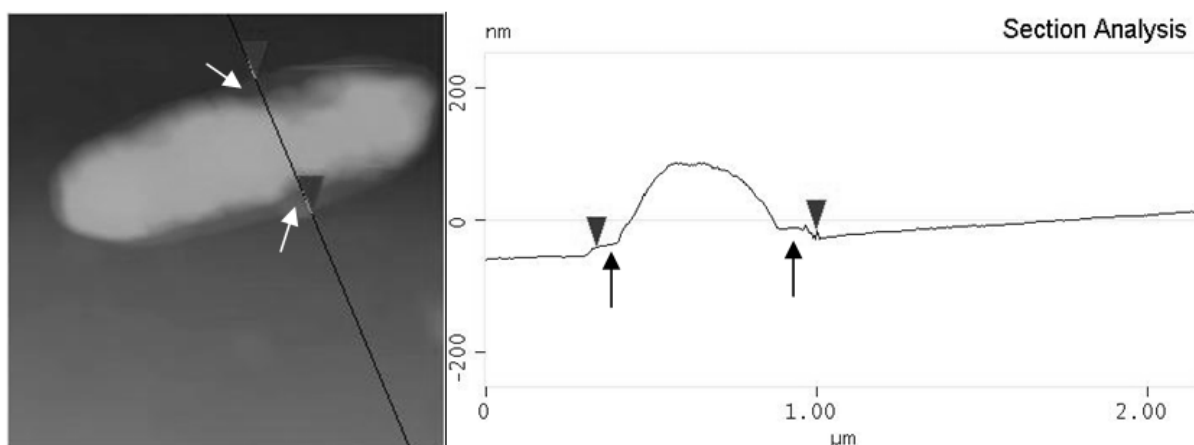


Рисунок 3 – АСМ-изображение и профиль сечения клетки синегнойной палочки.

Стрелками указаны участки клетки, утратившие клеточное содержимое и соответствующие им «уплощенные» фрагменты на разрезе бактерии.

На рисунке 4 представлены морфопараметрические характеристики клеток синегнойной палочки контрольных и опытных образцов: продольный размер бактериальных клеток (длина бактерий), поперечный размер (ширина

бактерий) и высота клеток. Математический анализ полученных данных выявил достоверное увеличение продольных и поперечных размеров клеток синегнойной палочки после воздействия ДС в рабочей концентрации (длина клеток в исходном образце колебалась от 1,22 до 2,38 мкм и составила в среднем $1,91 \pm 0,16$ мкм; после обработки ДС в рекомендуемой производителем концентрации средняя длина бактерий составляла $2,73 \pm 0,21$ мкм; после обработки ДС клетки бактерий были в 2,0 раза шире, ($p < 0,05$), После воздействия дезинфектанта в разведении $1/2$ от рабочей наблюдалось статистически достоверное увеличение ширины клеток (на 33,6%) и статистически значимое уменьшение высоты бактерий при воздействии минимальной сублетальной концентрации – «уплощение» клеток в 1,33 раза по сравнению с контрольным образцом ($p < 0,05$).

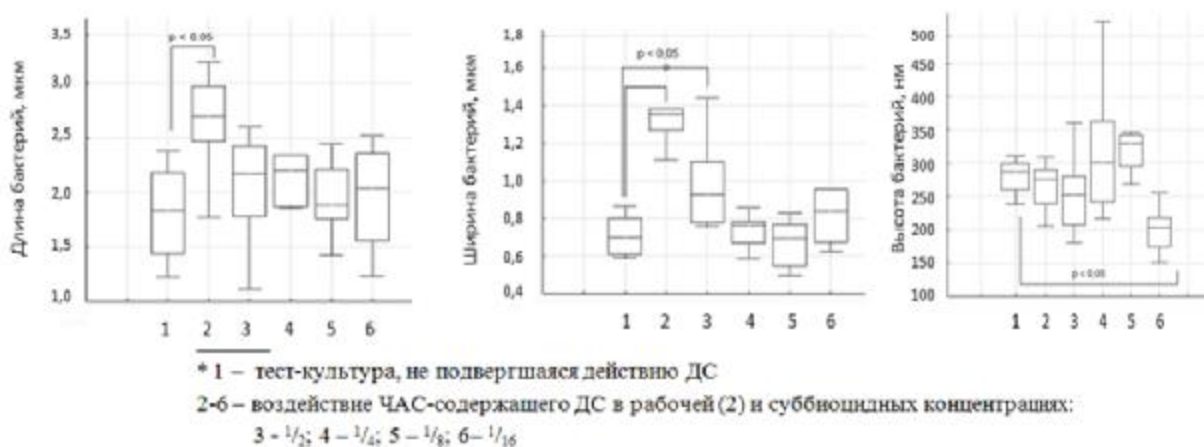


Рисунок 4 – Размеры бактериальных клеток *Pseudomonas aeruginosa* в контрольном (1) и опытных образцах (2-6)

Причиной зарегистрированных изменений морфологических параметров бактериальных клеток мог являться биологический эффект активно действующего вещества ДС на поверхностные образования бактерий. Бактериальные клетки при взаимодействии с дезинфектантом утрачивают свои каркасные формообразующие свойства и, соответственно, способность к поддержанию свойственной им морфологической формы.

Макробиомаркерами действия ДС на бактериальные клетки являются:

1) увеличение продольных и поперечных размеров бактериальных клеток на

35% и более; 2) «уплощение» клеток после воздействия ДС в рекомендованной производителем концентрации, что можно объяснить деструкцией клеточной стенки, дезорганизацией цитоплазматической мембраны и нарушением её проницаемости; 3) «излитие» клеточного содержимого, гибель клетки и образование теней бактериальных клеток (рисунок 2В).

По мере снижения концентрации химического вещества, изменения менее выражены, однако имеет место изменение отдельных пространственных характеристик – маркеров повреждающего эффекта ДС, что может быть объяснено «растягивающим» действием осмотического давления из-за нарушения проницаемости цитоплазматической мембраны при сохраненной ригидности клеточной стенки (недостовверное увеличение высоты клеток после обработки суббиоцидными концентрациями $1/8$ и $1/16$ (средняя высота бактерий соответственно $324,0 \pm 47,4$ и $318,7 \pm 17,5$ нм) по сравнению с контрольным образцом (высота $280,3 \pm 11,3$ нм) при сохранении поперечных размеров клеток бактерии).

Оценка изменений ультраструктуры и наномеханических свойств поверхностных образований бактериальных клеток под влиянием различных концентраций биоцида с помощью атомно-силовой микроскопии.

Дополнительным микромаркерным проявлением повреждающего действия биоцида на поверхностные структуры бактериальной клетки является существенное изменение шероховатости клеточной стенки в опытных образцах по сравнению с контрольными (таблица 1). При этом обусловленное воздействием дезинфектанта нарушение трехмерной пространственной организации пептидогликана результировалось в более чем двукратном увеличении шероховатости клеток *P.aeruginosa* (до $12,4 \pm 1,4$ нм, против $5,9 \pm 0,2$ нм в контроле, $p < 0,01$). При снижении концентрации наблюдалось менее выраженное увеличение шероховатости, а при воздействии ДС в концентрации меньше $1/4$ показатели шероховатости были меньше, чем в контрольном образце, что также можно объяснить как

действием осмотического давления, так и синтезом капсульных полисахаридов в присутствии субоптимальных концентраций ЧАС (рисунок 2Б).

Таблица 1 – Характеристика шероховатости поверхности бактериальных клеток в зависимости от воздействия различных концентраций ДС

Группы	Концентрация дезинфектанта	Среднее арифметическое отклонение профиля (Ra), nm	Наибольшая высота профиля (Rmax), nm
опыт	рабочая	12,4±1,4↑*	60.6↑
	¹ / ₂	8,9±0,3↑	27.8
	¹ / ₄	4,3±0,3↓	21.6↓
	¹ / ₈	4,4±0,2↓	26.9
	¹ / ₁₆	5,3±0,3	29.4
контроль	—	5,9±0,2	28.8

* - стрелками помечены статистически достоверное увеличение (↑) или уменьшение (↓) параметра по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Заключение

В результате исследования получены новые данные по изменению морфофункциональных характеристик и ультраструктуры отдельных бактериальных клеток и популяции *Pseudomonas aeruginosa* после воздействия дезинфицирующих средств в различных концентрациях.

Установлено, что атомно-силовая микроскопия позволяет визуализировать повреждения бактерий под влиянием активно действующего вещества дезинфицирующего средства. Свидетельством гибели клеток являются: «излитие» клеточного содержимого, значительная структурированность поверхности клеточной стенки (двукратное увеличение шероховатости поверхности бактерии), изменение морфологических параметров («уплощение» клеток, увеличение длины клеток, увеличение ширины клеток более чем в два раза). Суббицидные концентрации ЧАС-содержащего дезинфектанта вызывают менее глубокие изменения в структуре макромолекул поверхностных образований клетки: увеличивается проницаемость цитоплазматической мембраны при сохранении формообразующей функции клеточной стенки, что результируется в

достоверном увеличении высоты клеток и «сглаживании» поверхности бактерии (уменьшение шероховатости). При занижении рекомендуемой производителем концентрации дезинфектанта в четыре раза выявлено образование бактериальных капсульных полисахаридов.

Литература.

1. Hidron Alicia I., Edwards Jonathan R., Patel Jean et al. // *Infection control and hospital epidemiology*. 2008. Vol. 29. N. 11. P. 996-1011.
2. Higgins C.S., Murtoug S.M., Williamson E. et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2001. N 7. P. 308-315.
3. Ковалишена О.В., Благоднравова А.С., Воробьева О.Н. [и др.] // *Ремедиум. Приволжье*. 2008. №1 (61). С.49-51.
4. Семина Н.А., Ковалева Г.П., Галкин В.В. // *Дезинфекционное дело*. 2002. №3. С. 29-31.
5. Шандала М.Г. // *Дезинфекционное дело*. 2002. № 3. С. 19-25.
6. Веткина И.Ф., Комаринская Л.В., Ильин И.Ю., Соловьева М.В. // "ФАРМиндекс Практик". 2005. вып.7. С.13 – 20.
7. Воронина Э.В., Казанцева М.И., Гейн В.Л. // *Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации: материалы науч.-практ. конф. с межд. участием, посвящ. 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии, г.Пермь, 7 – 9 декабря 2011 года*. С. 58-61.
8. McDonnell G., Russel A.D. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1999. N 12. P. 147-149.
9. В.В. Шкарин, О.В. Ковалишена, А.С. Благоднравова и др. // *Медицинский альманах*. 2012. №3(22). С. 129 – 133.
10. Schilardi P.et al. // *Current Res Techn. Eder Farmastex*. 2010. P.860-869.
11. Dufrene Yves F.. // *J. Of Bacteriology*. 2002. Vol.184. N19. P.5206-5213.
12. Филонов [и др.] *Методы проверки и оценки антимикробной активности дезинфицирующих и антисептических средств: инструкция по применению МЗ РБ / В. П. Минск, 2003. 41 с.*
13. Denyer S.P., G.S. Stewart // *International Biodeterioration & Biodegradation* 1998. Vol. 41. Issues 3–4. P. 261–268.
14. Thomas L., Russell A.D., Maillard J.-Y. // *J. Appl. Microbiol.* 2005. Vol. 98. P. 533-43.
15. Gilbert P., Moore L.E. // *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99. Issue 4. P.703 – 715.

16. Allen, M. J., Morby, A. P., White, G. F. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004. Vol. 318, Issue 2. P. 397–404
17. Gomez Escalada, M., Harwood, J.L. // J. Antimicrob. Chemother. 2005. Vol. 55. P. 879-82.