© Попов М.М., Калініченко С.В., Чаусовська Т.А., Бабич Є.М., Коротких О.О., Ківва Ф.В., Коваленко О.І., Балак О.К.

УДК: 537.868.047:579.861.2(043.3)

Попов М.М.[1], Калініченко С.В.[1], Чаусовська Т.А.[1], Бабич Є.М.[1], Коротких О.О.[1], Ківва Ф.В.[2], Коваленко О.І.[2], Балак О.К.[3]

[1]Державна Установа "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України" (вул. Пушкінська, 14-16, м.Харків, 61057, Україна); [2]Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова Національної академії наук України (вул. Академіка Проскури, 12, м.Харків, 61085, Україна); [3]Харківський національний медичний університет (пр. Науки, 4, м.Харків, 61022, Україна)

ВПЛИВ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА ГАЗОВОГО СКЛАДУ АТМОСФЕРИ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ЗДАТНІСТЬ СТАФІЛОКОКІВ І КОРИНЕБАКТЕРІЙ ДО БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ

Резюме. *У статті наведено теоретичне і експериментальне обґрунтування впливу міліметрових хвиль різних частотних діапазонів та мікроаерофільних умов культивування на формування субпопуляцій патогенних коринебакетрій і золотистих*

стафілококів із низькою та високою здатністю до утворення біоплівок. Експериментально доведено, що електромагнітні хвилі в частотному діапазоні 42,2 ГГц здатні стимулювали утворення біоплівок тест-штамами Staphylococcus aureus та пригнічувати біоплівкоутворення патогенних коринебактерій. Під впливом опромінення при частоті 61,0 ГГц відмічено достовірне підвищення біоплівкоутворення тест-культур коринебактерій і тенденція до посилення даної властивості у окремих біоплівкоутворюючих штамів S.aureus. За мікроаерофільних умов культивування здатність золотистих стафілококів до утворення біоплівок підвищувалась, а патогенних коринебактерій - не змінювалась.

Ключові слова: *електромагнітне випромінювання, мікроаерофільні умови культивування, коринебактерії, стафілококи, біоплівки.*

Вступ

Ефективність використання електромагнітних полів низької інтенсивності (НЗВЧ-випромінювання) в біотехнологічних процесах також доведена рядом досліджень [1-6]. Отримані при опроміненні мікроорганізмів ефекти в подальшому можуть стати основою нових методів отримання вакцин, збільшення продуктивності при отриманні антибіотиків. Однак, публікації, присвячені дослідженню впливу НЗВЧ-випромінювання на різні мікроорганізми, нечисленні. На сучасному етапі розвитку науки багато вчених підтримують ідею про те, що основною формою існування мікроорганізмів є біоплівки, коли мікроорганізми прикріплюються до поверхні, з подальшим утворенням біополімерного матриксу та розвитком міжклітинних комунікацій [7-9]. У біоплівках обмін інформацією відбувається за допомогою спеціалізованих сигнальних молекул, завдяки чому мікробне співтовариство працює як єдиний організм [7, 9]. При цьому мікроорганізми, що входять до складу біоплівок, як правило, резистентні до протимікробних засобів, мають здатність протидіяти факторам імунного захисту і характеризуються здатністю до обміну інформацією між клітинами і колективною координацією експресії генів [7]. Описані дані багато в чому пояснюють процеси утворення біоценозів біологічних ніш, а також патогенез формування бактеріоносійства і хронічних форм інфекційних захворювань [7-9]. Тому, в останні роки, особлива увага приділяється, як здатності мікроорганізмів утворювати біоплівки, так і вивченню факторів, що впливають на зазначений процес. Зважаючи на вищенаведене, вельми важливим є дослідження впливу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону та умов культивування на здатність мікроорганізмів до утворення біоплівок.

Мета - обґрунтувати наукові підходи до створення засобів, що стимулюють утворення біоценозів та визначити перспективність застосування фізико-хімічних чинників для попередження формування біоплівок патогенними бактеріями.

Матеріали та методи

Як тест-культур використовували штами патогенных коринебактерий *Corynebacterium diphtheriae* (n=8), референс-штами *S.aureus* ATCC 25923 та S.aureus 209 P (ATCC 6538-P), а також штами *S.aureus,* вилучені від хронічних бактеріоносіїв (n = 10). Суспензії тест-культур мікроорганізмів готували відповідно до стандарту каламутності за шкалою McFarland за допомогою приладу Densi-La-Meter (Lachema, Чехія) і доводили до оптичної щільності 1,0 одиниця за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу. Синхронізацію культур проводили за допомогою дії низької температури.

Для опромінення суспензій мікроорганізмів електромагнітним полем у вузьких смугах частот (квазігармоніческіх сигнал) НЗВЧ-діапазону використовувалися генератори сигналів Г4-141 (f1 = 37,5-53,57) ГГц і Г4-142 (f2 = 53,57-78,33) ГГц. Пробірки з культурами при кімнатній температурі, без перемішування, тримали поблизу від отвору прямокутного рупора з перетином 6,0-5,0 см (для генератора Г4-141) і 8,5-6,5 см (для генератора Г4-142). Під час опромінення електромагнітним полем об'єкти знаходилися на відстані L ≈ 5-7 см від площини апертури, тобто в ближній зоні антени. У місці їх розташування щільність потоку потужності (ЩПП) досягала величин ~ 0,1 мВт/см^2 при нерівномірності опромінення в місці розташування об'єктів у межах 3 дБ, що пов'язано зі специфікою ближньої зони, кінцевими розмірами апертури та об'єктів, які опромінюються, а також низьким опором навантаження. Тест-культури золотистих стафілококів обробляли електромагнітним полем в частотних діапазонах 42,2 ГГц і 61,0 ГГц, при цьому експозиція впливу становила 3 години.

Мікроаерофільні умови культивування створювали у мікроанаеростатах за допомогою газогенеруючих пакетів Generator GENbox microaer (bioMerieux, Франція) або газової суміші, що була виготовлена у заводських умовах і складалась з 5% O_2, 10% CO_2 та 85% N_2.

Визначення здатності мікроорганізмів до утворення біоплівок. проводили з використанням полістирольних мікротитрувальних планшет за методикою, описаної *Stepanovic* зі співавторами в авторській модифікації [10]. Штами *S.aureus* вирощували впродовж 18-24 годин на живильному агарі. Потім готували суспензію культур мікроорганізмів в стерильному фізіологічному розчині з оптичною щільністю 1,0 одиниця за шкалою MacFarland. Приготовлені зразки бактерійних суспензій розводили (1:10) в стерильному 1% цукровому бульйоні, (кінцева мікробна навантаження становило 3x10^7 КУО/мл) і додавали по 200 мкл кожного зразка в лунки полістиролових планшетів в трьох повторах. Як негативний контроль в три лунки полістиролових планшетів додавали тільки 200 мкл стерильного поживного бульйону, що містить 1% глюкози. Планшети інкубували при 37°С протягом 24 годин, потім

вміст лунок відсмоктували, кожну лунку промивали тричі стерильним фізіологічним розчином. Планшети інтенсивно струшували, щоб видалити всі неадгезовані бактерії. Після просушування на повітрі, для забарвлення біоплівок в лунки планшета додавали по 200 мкл 0,1% кристалічного фіолетового і залишали на 15 хв. Потім кожну лунку промивали тричі стерильною дистильованою водою і висушували при кімнатній температурі. Барвник, пов'язаний з адгезованими клітинами, екстрагували впродовж 30 хв., додаючи по 200 мкл 96% етанолу в лунки планшета. Оптичну щільність біоплівок вимірювали на спектрофотометрі (Stat Fax) при довжині хвилі 492 нм. Виходячи з оптичної щільності зразків (ОЩЗ) і середньої оптичної щільності негативного контролю (ОЩК), за здатністю до біоплівкоутворення штами були розділені на групи: з сильною (4хОЩК<ОЩЗ), помірною (2хОЩК<ОЩЗ≤4хОЩК), слабкою (ОЩК<ОЩЗ≤2хОЩК) здатністю до утворення біоплівок або такі, які не здатні до біоплівкоутворення (ОЩЗ≤ОЩК).

Кожен експеримент проводили мінімум у трьох повторах. Статистичну обробку даних здійснювали з використанням пакету аналізу даних Statistica-8. Для оцінки достовірності відмінностей у показників використовували непараметричні критерії: критерій Вілкоксона і критерій знаків. Достовірність відмінностей відносних величин оцінювали за допомогою критерію χ-квадрат.

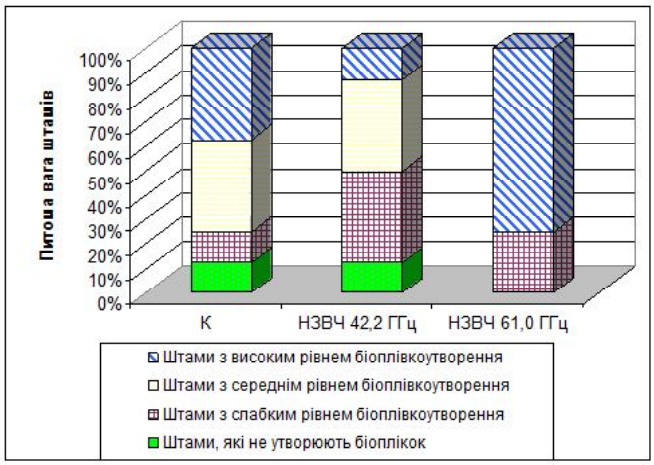


Рис. 1. Вплив електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону на здатність патогенних коринебактерій до утворення біоплівок.

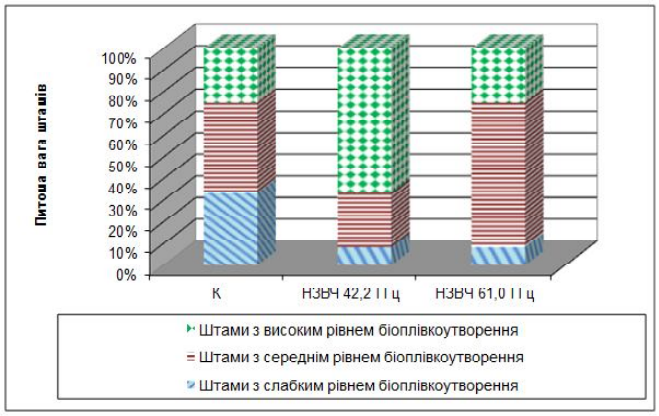


Рис. 2. Вплив електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону на здатність золотистих стафілококів до утворення біоплівок.

Результати. Обговорення

При дослідженні тест-культур патогенних коринебактерій встановлено, що у 12,5% досліджених штамів не спостерігалося утворення стійких біоплівок, 12,5% тест-культур проявляли слабку здатність, а по 37,5% штамів характеризувалися середнім і високим рівнем утворення біоплівок (рис. 1). Під впливом електромагнітних хвиль спрямованість змін залежала від частотного діапазону фізичного фактора, що застосовували для опромінення. Встановлено, що НЗВЧ-хвилі в частотному діапазоні 61,0 ГГц стимулювали у коринебактерій утворення біоплівок. Так, частка штамів, що володіють високою здатністю до формування біоплівок, зросла в 2,0 рази у порівнянні з контролем ($p<0,05$). Середні показники оптичної щільності сформованих біоплівок достовірно перевищували контрольні в 1,6 разів.

Зворотний ефект відзначений після опромінення коринебактерій ЕМП в частотному діапазоні 42,2 ГГц. Зазначений режим обробки призводив до того, що частка штамів з високою здатністю утворювати біоплівки знизилася з 37,5% до 12,5% ($p < 0,05$), а з низькою, навпаки - збільшилася (рис. 1). При порівнянні показників оптичної щільності биоплівок коринебактерий, що сформувалися після обробки ЕМП в вищевказаному частотному діапазоні, і контрольних зразків виявлена лише тенденція до зниження даного показника.

Дослідження тест-культур S.aureus показало, що всі штами були активними продуцентами. При цьому 33,3% тест-культур проявляли слабку здатність до біоплівкоутворення, 41,7% штамів характеризувалися середнім рівнем біоплівкоутворення, а 25,0% - високим (рис. 2).

Встановлено, що НЗВЧ-хвилі в частотному діапазоні 42,2 ГГц проявляли стимулюючий вплив на біоплівкоутворюючу здатність тест-штамів *S.aureus*. Як видно з рис. 1, частка штамів з високою здатністю до формування біоплівок, зросла в 2,7 разів у порівнянні з контролем ($p<0,05$), а кількість штамів із середньою та низькою здатністю до утворення біоплівок, навпаки, зменшилась в 1,7 та 4,0 разів відповідно.

При порівнянні показників оптичної щільності біоплівок золотистих стафілококів, що сформувалися після обробки ЕМП в частотному діапазоні 61,0 ГГц і контрольних зразків достовірної різниці не було виявлено. Проте, зазначений режим обробки призводив до того, що частка штамів з середньою здатністю утворювати біоплівки збільшилась в 1,6 рази, а з низькою, навпаки - зменшилась в 4,0 рази (рис. 2). Тому ефекти впливу

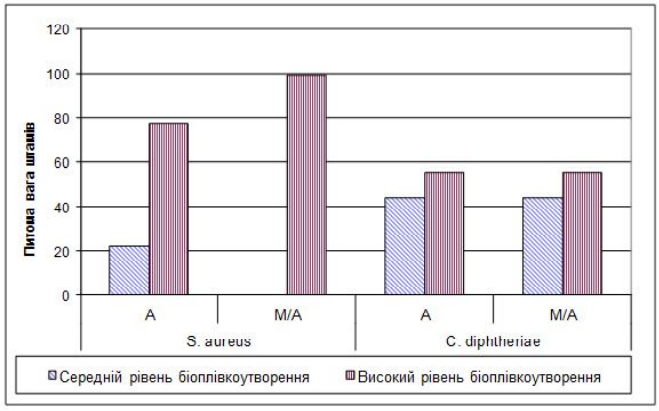


Рис. 3. Вплив умов культивування на ступінь біоплівкоутворення золотистих стафілококів та патогенних коринебактерій.

ЕМП частотного діапазону 61,0 ГГц потребують подальшого та більш детального вивчення, оскільки в ході проведених досліджень вдалося визначити відзначено тільки тенденції впливу.

Також було вивчено вплив умов культивування на біоплівкоутворення вищезазначених мікроорганізмів.

З'ясовано, що умови газового складу атмосфери культивування не впливали на ступінь біоплівкоутворення *C.diphtheriae*. В атмосфері зниженого парціального тиску кисню та підвищеного вмісту вуглекислого газу всі досліджені штами *S.aureus* мали високий ступень біоплівкоутворення (рис. 3).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Здатність до утворення біоплівок виявлена у 87,5% тест-культур коринебактерій та у всіх досліджених штамів *S.aureus*. При цьому серед патогенних коринебактерій по 37,5% штамів володіли середнім і високим рівнем біоплівкоутворення, а серед золотавих стафілококів 41,7% та 25,0% штамів володіли відповідно середнім і високим рівнями біоплівкоутворення.

2. Міліметрові хвилі в частотному діпазоні 61,0 ГГц достовірно стимулювали утворення біоплівок патогенними коринебактеріями. Щодо впливу зазначених фізичних чинників на золотисті стафілококи виявлена тенденіція посилення біоплівкоутворення для окремих тест-культур.

3. Електромагнітні хвилі в частотному діапазоні 42,2 ГГц пригнічували біоплівкоутворення тест-культур коринебактерій, але стимулювали утворення біоплівок тест-штамами *S.aureus*. За мікроаерофільних умов культивування здатність золотистих стафілококів до утворення біоплівок підвищувалась, а патогенних коринебактерій - не змінювалась.

Перспективним для подальших досліджень є наукове обгрунтування використання міліметрових хвиль в діапазоні 61,0 ГГц для стимуляції утворення біоплівок в мікробіологічній промисловості.

Список літератури

1. Девятков Н.Д. Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн /Н.Д.Девятков, М.Б.Голант, О.В.Бецкий.- М.: Изд-во ИРЭ РАН, 1994.- 164с.
2. Кряжев Д.В. Новые аспекты применения низкоинтенсивных излучений (НЗВЧ) в экобиотехнологии / Д.В.Кряжев, В.Ф.Смирнов //Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И.Лобачевского.- 2010.- №2.- С.418-422.
3. Кудряшов Ю.Б. Биологические основы действия микроволн (учебное пособие) /Ю.Б.Кудряшов, Э.Ш.Исмаилов, С.М.Зубкова.- М.: Изд-во Моск. ун-та, 2002.- 159с.
4. Ситько С.П. Введение в квантовую медицину /С.П.Ситько, Л.Н.Мкртчян.- К.: Пантеон, 2004.- 147с.
5. Adey W.R. Tissue interaction with no ionizing electromagnetic fields / W.R.Adey //Physiol. Rev.- 2001.- Vol.61, №2.- P.435-514.
6. Blinowska K.J. Membranes as a Possible Site of Frolics Coherent Oscillations / K.J.Blinowska, W.Lech, A.Wittlin // Phys. Letters.- 2005.- Vol.109A, №3.- P.124-126.
7. Cortes M.E. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication / M.E.Cortes, J.C.Bonilla, R.D.Sinisterra //J. FORMATEX.- 2011.- P.896-905.
8. Mah Thien-Fah C. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents /C.Mah, Thien-Fah, A.O'Toole George //J. Microbiology.- 2001.- Vol.9, №1.- P.34-39.
9. Myszka K. Mechanisms Determining Bacterial Biofilm Resistance to Antimicrobial Factors /K.Myszka, K.Czaczyk //Antimicrobial Agents.- P.213-238.
10. Quantification of biofilm production on polystyrene by Listeria, Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolated from a poultry slaughterhouse / L.B.Rodrigues, L.R.Santos, V.Z.Tagliari [et al.] //Brazilian J. of Microbiology.- 2010.- Vol.41.- P.1082-1085.

Попов Н.Н., Калиниченко С.В., Чаусовская Т.А., Бабич Е.М., Коротких О.О., Кивва Ф.В., Коваленко О.И., Балак А.К.

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ГАЗОВОГО СОСТАВА АТМОСФЕРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СПОСОБНОСТЬ СТАФИЛОКОККОВ И КОРИНЕБАКТЕРИЙ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНОК

Резюме. *В статье приведено теоретическое и экспериментальное обоснование влияния миллиметровых волн разных частотных диапазонов и микроаэрофильных условий культивирования на формирование субпопуляций патогенных коринебактерий и золотистых стафилококков с низкой и высокой способностью к образованию биопленок. Экспериментально доказано, что электромагнитные волны в частотном диапазоне 42,2 ГГц способны стимулировать образование биопленок тест-штаммами Staphylococcus aureus и подавлять биопленкообразование патогенных коринебактерий. Под влиянием облучения при частоте 61,0 ГГц отмечено достоверное повышение биопленкообразования тест-культур коринебактерий и тенденция к стимуляции данного свойства у отдельных биопленкообразующих штаммов S. aureus. При микроаэрофильным условиях культивирования способность золотистых стафилококков к образованию биопленок повышалась, а патогенных коринебактерий - не изменялась.*

Ключевые слова: *электромагнитное излучение, микроаэрофильные условия культивирования, коринебактерии, стафилококки, биопленки.*

Popov M.M., Kalinichenko S.V., Chausovska T.A., Babych E.M., Korotkikh O.O., Kivva F.V., Kovalenko O.I., Balak O.K.

THE INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC IRRADIATION AND GAS COMPOSITION OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE ABILITY OF STAPHYLOCOCCI AND CORYNEBACTERIA TO BIOFILM FORMATION

Summary. *Theoretical and experimental substantiation of millimeter waves in different frequency bands and microaerophilic cultivation conditions influence on the formation of staphylococci and corynebacteria subpopulations with low and high ability to form biofilms is presented in the article. It was experimentally proved that electromagnetic waves in the frequency range of 42.2 GHz were able to stimulate Staphylococcus aureus test-strains biofilms formation and inhibited biofilms formation of pathogenic corynebacteria. It was shown the significant increase of corynebacteria test-cultures biofilm formation and the tendency to increasing of the properties in some strains of S. aureus under the influence of irradiation in 61.0 GHz frequency range. For microaerophilic cultivation conditions ability of Staphylococcus aureus to the formation of biofilms increased, but for pathogenic corynebacteria it was unchanged.*

Key words: *electromagnetic irradiation, microaerophilic conditions, corynebacteria staphylococci, biofilms.*

Рецензент - д.мед.н., професор Коляда Т.І.

Стаття надійшла до редакції: 9.11.2015 р.

Попов Миколай Миколайович - д.мед.н., професор, директор ДУ "ІМІ НАМН"; imidir@ukr.net
Калініченко Світлана Вікторівна - к.мед.н., ст.н.с., провідний науковий співробітник лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ "ІМІ НАМН"; kalinichenko_sv@ukr.net
Бабич Євгеній Михайлович - д.мед.н., професор, завідувач лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ "ІМІ НАМН"; babych_em@ukr.net
Чаусовська Тетяна Анатоліївна - к.мед.н., ст.н.с., провідний науковий співробітник лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ "ІМІ НАМН"; ta_ryzhkova@ukr.net
Коротких Олена Олегівна - аспірант очної форми навчання лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ "ІМІ НАМН"; +38 057 73-13-151
Ківвa Фелікс Васильович - д. фіз.-мат. н., професор, керівник наукового відділу ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАНУ; secretar@ire.kharkov.ua
Коваленко Ольга Іванівна - к. фіз.-мат. н., науковий співробітник наукового відділу ІРЕ ім.О.Я. Усикова НАНУ; secretar@ire.kharkov.ua
Балак Олексій Кузьмич - к.мед.н. асистент кафедри мікробіології ХНМУ; +38 057 70-77-362