



и, следовательно, в точке $z = n \cdot 1,6180$ происходит перестройка нестационарных режимов изменения \bar{x}^n в стационарные.

Таким образом, моменты любого порядка связаны с пропорцией золотого сечения, в чём и проявляется гармоничность процесса ($N(t)$, $I(t)$). Примечательно, что эта пропорция встречается в различных разделах естественных наук и статистическая физика не является исключением.

Выводы

В рамках модельного стохастического дифференциального уравнения со случайным параметром показано, что через золотое сечение естественные системы приобретают стационарный режим существования, функциональную устойчивость.

Необходимым условием этого эффекта является концепция двойственности, согласно которой параметрические флуктуации, моделирующие воздействие внешней среды, представляются в виде дихотомического шума, имеющего в своей структуре две функции распределения: Эрланга первого порядка и типичной для марковских процессов показательной-степенной.

Список литературы

1. Фейнман Р., Лейтон Р., Сэндс М. Фейнмановские лекции по физике : в 9 т. ; пер. с англ. Т. 9. Квантовая механика II. М. : Мир, 1967. 260 с.
2. Попков В. В., Шипицин Е. В. Золотое сечение в цикле Карно // УФН. 2000. Т. 170. С. 1253–1255.
3. Владимиров Ю. С. Метафизика. М. : Бином, 2002. 534 с.
4. Климонтович Ю. Л. Статистическая физика. М. : Наука, 1982. 606 с.
5. Ахманов С. Ф., Дьяков Ю. Е. Введение в статистическую физику и оптику. М. : Наука, 1981. 640 с.
6. Гардинер С., Кристин В. Стохастические методы в естественных науках. М. : Мир, 1986. 526 с.
7. Тихонов В. И., Кульман Н. К. Нелинейная фильтрация и квазикогерентный приём сигналов. М. : Сов. радио, 1975. 704 с.
8. Хорстхемке В., Лефевр Р. Индуцированные шумом переходы. М. : Мир, 1987. 397 с.
9. Попков В. В. Двойственность // Тектологический альманах. 2000. № 1. С. 4–67.
10. Сироткин О. Л. Особенности моментных функций осциллятора с параметрической нестабильностью, обусловленной дихотомическим шумом с эрланговскими функциями распределения // Изв. вузов. Радиофизика. 2009. Т. 52, № 11. С. 921–932.
11. Болотин В. В., Москвин В. Г. О параметрических резонансах в стохастических системах // Изв. АН СССР. Механика твёрдого тела. 1972. № 4. С. 88–94.
12. Карлин С. Основы теории случайных процессов. М. : Мир, 1971. 536 с.

УДК 579.23:53.086:615.281

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МИКРОБНУЮ КЛЕТКУ (НА ПРИМЕРЕ *E. COLI* И ЦЕФАЛОСПОРИНОВ I ПОКОЛЕНИЯ)



П. С. Ерохин, Д. В. Уткин, О. С. Кузнецов,
Н. П. Коннов, Н. А. Осина

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов
E-mail: rusrap1@microbe.ru

Методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано изменение клеточной стенки *E. coli* под воздействием Цефазолина-АКОС. С использованием режимов прерывистого и непрерывного контакта установлено, что повреждающее действие антибиотика Цефазолин-АКОС отмечено через 30 мин экспозиции. Физические показатели позволяют получать более полную информацию о воздействии антибиотика на микроорганизмы.

Ключевые слова: АСМ, полуконтактный режим, контактный режим, микроорганизмы, антибактериальные препараты, шероховатость, сила адгезии, распределение латеральных характеристик, чувствительность.

Application of Atomic Force Microscopy for Detection of Influence of Antibiotic Upon the Microbial Cell (on the Model of *E. coli* and I Generation Cephalosporins)

P. S. Erokhin, D. V. Utkin, O. S. Kuznetsov,
N. P. Konnov, N. A. Osina

Alteration of *E. coli* cell wall caused by Cefazolin-AKOS was observed atomic force microscopy (AFM). Using semi-contact and contact modes the damaging effect of the Cefazolin-AKOS antibiotic was shown after a 30 minutes exposure. The assessment of physical



parameters of cell allow to get more detailed information on the effect of antibiotics on microorganisms.

Key words: AFM, semi-contact mode, contact mode, microorganisms, antibacterial agents, roughness, adhesion force, distribution lateral characteristics, sensitivity.

Введение

В последние годы отмечается тенденция к распространению множественной резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, что существенно снижает эффективность противомикробной терапии.

На сегодняшний день основными регламентируемыми способами определения чувствительности бактерий к противомикробным препаратам являются метод серийных разведений и диско-диффузионный метод [1]. Кроме того, для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам рядом исследователей предложено использование различных методов: радиоиммунного (RIA) и ферментативного анализа [2, 3], поверхностного плазмонного резонанса [4, 5], оптических и биочипов [6, 7]. Однако указанные методы длительны или требуют использования специфических меток, кроме того, обладают недостаточной информативностью анализа.

Альтернативным методом определения чувствительности бактерий к антибиотикам является атомно-силовая микроскопия (АСМ).

Так, рядом авторов [8–10] были сделаны первые шаги по привлечению методов АСМ в качестве инструмента определения бактерицидного действия антибиотиков в отношении кишечных инфекций. В [8] показано, что одним из параметров, характеризующих активность цефодизиминов в отношении бактерий, является шероховатость клеточной стенки микроорганизмов. Более того, с использованием полуконтактного метода было установлено [9], что у бактерий, обработанных ванкомицином, кроме увеличения шероховатости поверхности бактерий отмечалось значительное снижение их высоты. Так, на модели *P.aeruginosa* и *E.coli* [10] методом рассогласования выявлено бактерицидное действие аминогликозидов.

Однако представленные выше данные получены с использованием только бесконтактного режима исследований и не охватывают всего многообразия параметров АСМ, которые в настоящее время могут дать значительные дополнительные характеристики микроорганизмов в условиях действия антибиотика.

Цель работы заключалась в оценке возможностей применения АСМ для определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

1. Материалы и методы

Культуру *E.coli* на абиотической поверхности выращивали в LB бульоне на круглом покровном стекле диаметром 18 мм (Merck, Германия), помещенном в чашки Петри (диаметром 4 см) в течение 24–48 ч при температуре 37 °С.

С целью изучения динамики изменения физических характеристик микроорганизмов – шероховатости, адгезивности, разности латеральных сил штамм обрабатывали антибактериальным препаратом («Цефазолин-АКОС» (Синтез, Россия)) в субингибирующих концентрациях от 10 до 50 мкг/мл с экспозицией 30 мин и 1 ч.

Цефазолин относится к группе цефалоспоринов, которые на современном этапе широко применяются в клинической практике благодаря высокой эффективности и низкой токсичности.

Принцип действия цефалоспоринов, как и других бета-лактамовых антибиотиков, заключается в нарушении синтеза клеточной стенки бактерий, что приводит к их гибели. Эффективность визуализации поверхностных структур бактериальных клеток с помощью АСМ определила выбор цефазолина в качестве объекта исследований.

Фиксацию и обеззараживание материала проводили 2.5% раствором глутаральдегида с экспозицией 2 ч при температуре 4 °С. Для удаления фиксатора биопрепарат центрифугировали в бидистиллированной воде при 6000 об./мин в течение 20 мин. Перед проведением АСМ 4 мкл суспензии высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Работа проводилась на атомно-силовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) с использованием кремниевых кантилеверов NSG01 (NT-MDT, Россия), напыленных золотом, для полуконтактной АСМ (резонансная частота кантилевера составляла 120 кГц, константа жесткости – 5.5 Н/м) и CSG10 (NT-MDT, Россия) для контактной АСМ (резонансная частота – 20 кГц, константа жесткости – 0,1 Н/м). Исследования выполняли в режимах прерывистого и непрерывного контакта АСМ следующими методами: полуконтактным, рассогласования, латеральных сил и модуляции силы.

Исследования проводились при оптимальных значениях основных параметров сканирования (амплитуда колебаний кантилевера



Resonance 22 единицы, начальная фаза его колебаний **Phase** 240°, скорость сканирования **Frequency** 0.75 Гц, коэффициент усиления цепи обратной связи **FB Gain** 0.3 единицы, **Set Point** 19 единиц (величина **Set Point** и начальный уровень сигнала **DFL** определяли величину силы взаимодействия зонда с поверхностью образца)).

Последовательность АСМ изображений и кривых АСМ спектроскопии изучаемых объектов подвергалась обработке в программном обеспечении микроскопа (Image Analysis). В качестве отрицательного контроля был выбран препарат, не обработанный антибиотиком.

Среднюю арифметическую и среднюю квадратичную шероховатости поверхности бактерий определяли методом Roughness analysis по 10 значениям, полученным в эксперименте, с указанием абсолютной погрешности.

Указанный метод способствовал вычислению основных статистических параметров исходного объекта и построению гистограммы плотности распределения значений дискретной функции, заданной в плоскости XY:

$$Z_{ij} = Z(X_i, Y_j),$$

где X_i и Y_j – число точек по осям X и Y .

Дополнительный анализ взаимодействия антибиотика с бактериями проводили с использованием полуконтактной АСМ на основе расчета автокорреляционной функции, которая определяется как усредненное по достаточно большой площади произведение высот рельефа в двух точках, отстоящих одна от другой на некотором расстоянии. При ее расчетах использовалась функ-

ция высоты рельефа, которая отсчитывалась от условно взятой средней плоскости – поверхности подложки, на которую наносился биопрепарат. Для изотропной поверхности, такой как покровное стекло с нанесенными на него бактериями, функция автокорреляции определялась как скалярное произведение средней арифметической и средней квадратичной шероховатостей объекта исследований.

Для обработки АСМ изображений использовали программу Nova (NT-MDT, Россия), позволяющую редактировать полученные АСМ изображения, а также представлять их в дву- (2D) и трехмерном (3D) формате.

2. Результаты

2.1. Полуконтактная АСМ

2.1.1. Метод Roughness analysis (анализ шероховатости)

Полученные значения средней арифметической и средней квадратичной шероховатостей поверхности бактерий составляли 38 и 47 нм для экспозиции препарата 30 мин, 47 и 60 нм для 60 мин соответственно. При концентрации антибактериального препарата менее 30 мкг/мл нарушения ультраструктуры клеточной стенки не обнаруживалось (табл. 1, рис. 1, 2). Также из табл. 1 видно, что повышение концентрации антибиотика выше указанных значений приводило к повышению средней арифметической и средней квадратичной шероховатостей, что отражает нарушения метаболических процессов микроорганизмов.

Таблица 1

Характеристики поверхности бактерий и биопленок *Escherichia coli* в условиях действия антибиотика

Время действия, мин	Концентрация мкг/мл	Шероховатость, нм				Толщина матрикса, нм	Автокорреляция, нм ²	
		Средняя арифметическая		Средняя квадратичная			Бактерия	Биопленка*
		Бактерия	Биопленка*	Бактерия	Биопленка*			
0	0	14.9±1.4	0	17.67±1.5	0	0	263.28	0
30	10	24.05±2.85	142.89	27.02±2.1	178.72	250–350	649.83	25537.3
30	20	26.69±2.11	207.71	31.61±3.2	243.40	600–700	841.67	50556.6
30	30	38.67±3.5	67.71	47.71±4.7	89.53	250–350	1844.94	6062.07
30	40	40.51±3.3	96.85	50.85±5.2	118.54	450–550	2059.93	11480.6
30	50	39.08±3.1	56.73	49.33±3.6	82.21	100–150	1927.81	4663.77
60	10	52.02±5.1	71.08	63.66±5.8	87.22	350–500	3311.59	6199.59
60	20	16.19±2	114.18	19.41±2	151.92	200–300	314.24	17346.2
60	30	46.90±4.1	203.98	60.28±5.5	240.05	150–200	2827.13	48965.4
60	40	27.08±2.4	175.28	34.55±3.1	204.28	500–600	935.61	35806.2
60	50	22.78±2.11	69.44	27.18±2.2	85.20	250–300	619.16	5916.3

*Формируется в неблагоприятных условиях существования микроорганизмов, к которым относится влияние антибиотиков.

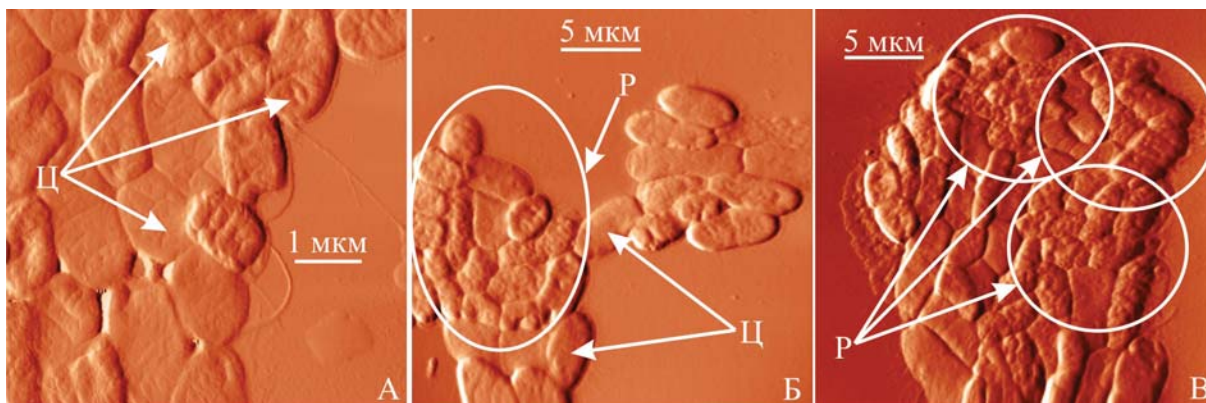


Рис. 1. АСМ изображения *E.Coli* на абиотической поверхности. Метод рассогласования. Экспозиция антибиотика: а – 0 минут, б – 30 минут, в – 60 минут. Концентрация антибиотика 30 мкг/мл. Ц – целые клетки, P – разрушенные клетки

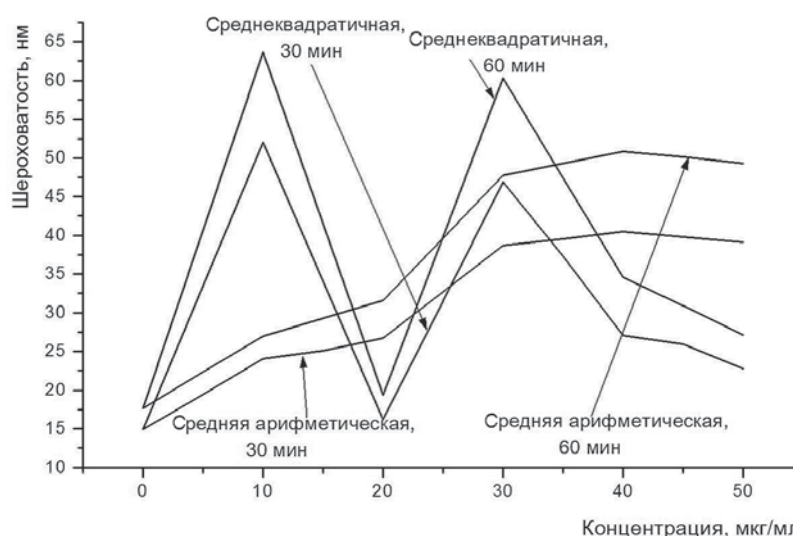


Рис. 2. Динамика изменения шероховатости клеточной стенки микроорганизмов под действием антибиотика

2.1.2. Расчет автокорреляционной функции

Полученные данные представлены в табл. 1. Изменение значений функции автокорреляции, по всей вероятности, связано с ингибированием синтеза мукопептидов, что приводит к разрушению бактериальных клеточных мембран и лизису бактерий.

Таким образом, полуконтактным методом АСМ показано, что концентрация антибиотика, равная 30 мкг/мл, является сублетальной для *Escherichia coli* и минимальной для проведения анализа чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

2.2. Контактные методы и АСМ спектроскопия

Как известно, в контактном методе модуляции силы кантилевер совершает вертикальные колебания сканера. В зависимости от локальной жесткости поверхности образца изменяется ве-

личина его продавливания и изгиба кантилевера. На жестких участках поверхности величина продавливания поверхности от зонда будет минимальной, а величина изгиба кантилевера максимальной.

Метод латеральных сил позволил различить области с различными коэффициентами трения биопрепарата, а также выявить особенности рельефа поверхности бактерий (рис. 3, табл. 2). Области с более высоким трением обладали повышенной яркостью, что являлось следствием формирования защитной реакции бактерий – внеклеточного матрикса предположительно полисахаридной природы.

Указанные методы в совокупности с АСМ спектроскопией использовались в дальнейшем для определения сил адгезии и латеральных характеристик бактерий с целью динамической характеристики микроорганизмов.

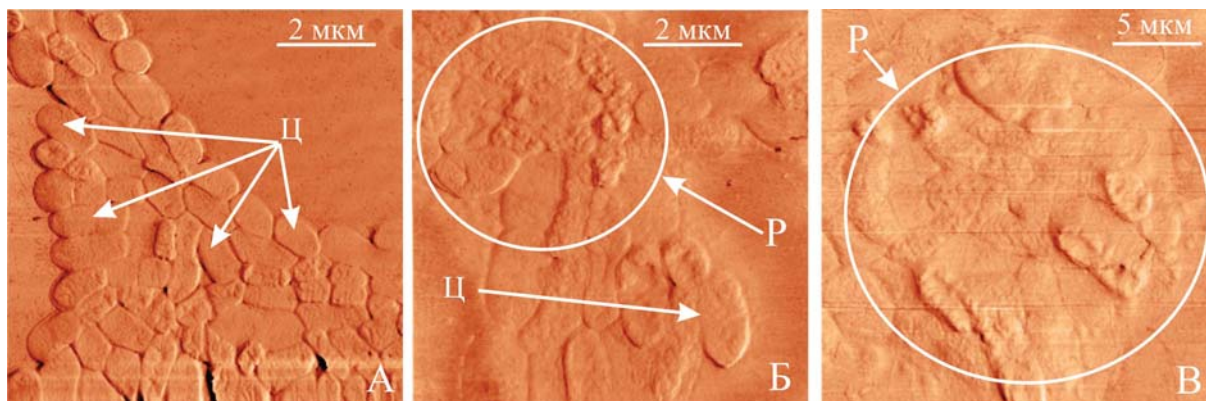


Рис. 3. АСМ изображения *E. coli* на абиотической подложке. Метод латеральных сил. Экспозиция антибиотика: а – 0 минут, б – 30 минут, в – 60 минут. Концентрация антибиотика 30 мкг/мл. Ц – целые клетки, Р – разрушенные клетки

Таблица 2

Силловые характеристики бактерий *Escherichia coli* в условиях действия антибиотика

Время действия, мин	Концентрация, мкг/мл	Сила адгезии, нН	Разность латеральных сил, пН		
			Бактерия-стекло	Бактерия-матрикс	Матрикс-стекло
0	0	15±2.5	30–40	–	–
30	10	15.16±1.83	3–4	7–10	4–6
30	20	16.11±1.98	38–40	25–31	9–13
30	30	17.78±1.91	18–22	45–50	63–72
30	40	20.41±0.35	20–27	40–45	18–20
30	50	15.21±1.43	15–20	30–45	55–60
60	10	15.21±3.29	0.03–0.05	0.04–0.07	0.07–0.12
60	20	21.54±4.51	2–5	48–60	50–55
60	30	18.81±2.47	28–32	8–12	30–40
60	40	18.6±2.94	35–40	95–115	60–75
60	50	10.96±1.18	35–40	70–84	35–44

При регистрации дополнительного торсионного изгиба получены новые данные, обусловленные моментом силы, действующей на острие зонда (см. рис. 3). Физическая сущность указанного метода заключается в том, что угол закручивания зонда при его малых отклонениях пропорционален латеральной силе. Величина же угла закручивания кантилевера измеряется оптической системой регистрации АСМ. В дальнейшем система регистрации формирует сигнал LF, который используется для получения изображения локальной силы трения по поверхности образца.

Из табл. 2 и рис. 4 видно, что с использованием контактных методов модуляции силы и латеральных сил было подтверждено, что 30-минутная экспозиция антибиотика в концентрации 30 мкг/мл является минимальной для определения чувствительности бактерий к антибиотикам (на примере *E. coli* и цефлоспоринов I поколения).

При этой концентрации происходит увеличение экспрессии адгезинов, способствующее разрыхлению мозаичной структуры наружной и внутренней мембраны бактериальной клетки, что проявляется в увеличении силы адгезии с экстремумом при сублетальной концентрации вносимого антибиотика.

Шестидесятиминутная экспозиция 10 мкг/мл антибактериального препарата способствовала частичной редукции клеточной стенки и приводила к инаktivации бактерий кишечной палочки.

Последующее снижение значений силы адгезии было связано с ингибированием синтеза мукопептидов, участвующих в образовании пептидогликана, что сопровождалось гибелью бактерий *E. coli*.

Заключение

Полученные данные показывают, что минимальным временем, необходимым для опре-

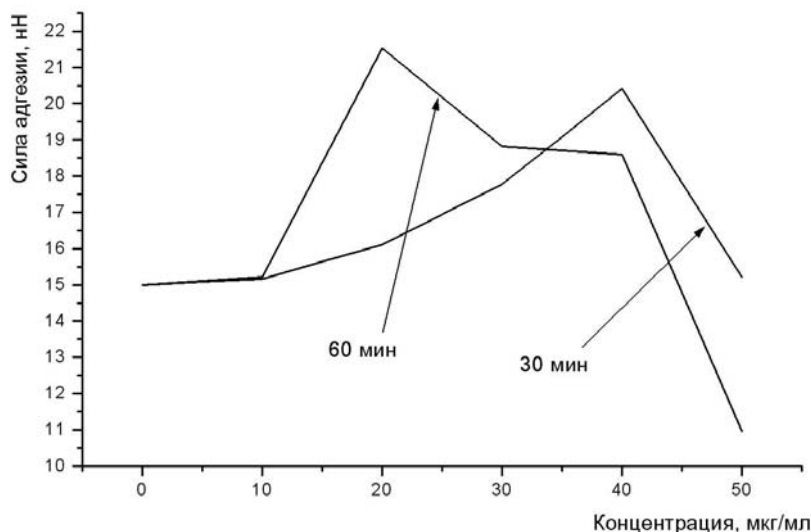


Рис 4. Динамика изменения силы адгезии микроорганизмов под действием антибиотика

деления чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам с использованием комплекса методов АСМ (прерывистого и непрерывного контакта) на основе определения шероховатости и функции автокорреляции клеточной стенки, а также силы адгезии и распределения латеральных характеристик, является 30 мин.

Сублетальной концентрацией препарата в данных условиях является 30 мкг/мл. Экспозиция антибиотика, равная 60 мин, позволяет снизить концентрацию препарата до 10 мкг/мл. Указанные концентрации и время экспозиции приводили к разрушению клеточной стенки микроорганизмов.

Таким образом, на основании измерения с помощью АСМ физических показателей – шероховатости клеточной стенки, силы адгезии микроорганизмов к покровному стеклу и разности латеральных сил, в течение короткого промежутка времени (30–60 мин) можно получить информацию о чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Список литературы

1. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. М., 2004. 91 с.
2. Saranya S., Hemashenpagam N. Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of Lactic acid bacteria from fermented dairy products // Adv. in Appl. Sci. Res. 2011. Vol. 2, № 4. P. 528–534.
3. Liasi S. A., Azmi T. I., Hassan M. D., Shuhaimi M., Rosfarizan M., Ariff A. B. Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu // Malaysian J. of Microbiol. 2009. Vol. 5, № 1. P. 33–37.
4. Fuhrmann A., Ros R. Single-molecule force spectroscopy : a method for quantitative analysis of ligand-receptor interactions // Nanomedicine. 2010. Vol. 5, № 4. P. 657–666.
5. Deisingh A. Biosensors for microbial detection // Microbiologist. 2003. Vol. 2. P. 30–33.
6. Lourenco F. R., Pinto T. de J. A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system // Braz. J. of Pharm. Sci. 2011. Vol. 47, № 3. P. 573–584.
7. Vora G. J., Meador C. E., Bird M. M., Bopp C. A., Andreadis J. D., Stenger D. A. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio spp.* // PNAS. 2005. Vol. 102, № 52. P. 19109–19114.
8. Braga P.C., Ricci D. Atomic force microscopy : application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime // Antimicrob. agents and chemother. 1998. Vol. 42, № 1. P. 18–22.
9. Nikiyan H., Vasilchenko A., Deryabin D. AFM investigations of various disturbing factors on bacterial cells // Formatex. 2010. P. 523–529.
10. Ouberai M., Garch F. E., Bussiere A., Riou M., Alsteens D., Lins L., Baussanne I., Dufrene Y. F., Bresseur R., Decout J.-L., Mingeot-Leclercq M.-P. The *Pseudomonas aeruginosa* membranes: A target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? // Biochim. et Biophys. Acta. 2011. Vol. 1808. P. 1716–1727.