

Рус. : УДК: 537.868.047:579.871.1(043.3)

Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на способность патогенных коринебактерий к образованию биопленок

Рыжкова Татьяна Анатольевна, Калиниченко Светлана Викторовна, Бабич Евгений Михайлович, Коротких Елена Олеговна, Хворостяная Вера Алексеевна

Аннотация: В статье приведены теоретическое и экспериментальное обоснование влияния миллиметровых волн различных частотных диапазонов на формирование субпопуляций патогенных коринебактерий с низкой и высокой способностью к образованию биопленок. Экспериментально доказано, что электромагнитные волны в частотном диапазоне 61,0 ГГц оказывали стимулирующее воздействие на биопленкообразующие способности коринебактерий, а в диапазоне 42,2 ГГц, напротив, угнетали изучаемые свойства.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, коринебактерии, биопленки.

Eng.: *The Influence of Electromagnetic Irradiation of Millimeter Range on the Ability of Pathogenic Corynebacteria to Biofilm Formation*

Ryzhkova Tetyana Anatoliivna, Kalinichenko Svetlana Viktorovna, Babych Eugen Mikhailovich, Korotkikh Elena Olegovna, Khvorostyanaya Vera Alekseevna

Abstract: Theoretical and experimental substantiation of millimeter waves in different frequency bands influence on the formation of pathogenic corynebacteria subpopulations with low and high ability to form biofilms is presented in the article. It was experimentally proved that electromagnetic waves in 61,0 GHz frequency range, stimulated ability of corynebacteria to form biofilms; irradiation 42,2 GHz frequency range, on the contrary, inhibited these properties.

Key words: electromagnetic irradiation, corynebacteria, biofilm.

Введение

В условиях проведения вакцинопрофилактики эпидемический процесс дифтерийной инфекции реализуется преимущественно в виде бактерионосительства. Интенсивность циркуляции патогенных коринебактерий напрямую связана с периодическим формированием эпидемически значимых (более вирулентных и приспособленных к колонизации) популяций возбудителя.

Электромагнитное поле (ЭМП), как возможный индуктор изменчивости микроорганизмов, обратило на себя внимание в связи с исследованиями роли

метеорологических условий в возникновении и развитии инфекционных заболеваний. Обсуждение вопросов физических механизмов действия слабых ЭМП на биообъекты особенно активно проводится в последнее время [1-6]. Ключевая идея о чувствительности биологических объектов к слабым ЭМП основывается на предположении, что миллиметровые волны оказываются естественными для биообъектов и могут использоваться клетками в направлении «управления» основными физиологическими функциями.

Терапевтический эффект излучения миллиметрового диапазона, крайне высокой частоты и низкой интенсивности (КВЧ-излучения) на сегодняшний день доказан при многих заболеваниях человека. Эффективность использования электромагнитных полей низкой интенсивности (КВЧ-излучение) в биотехнологических процессах также доказана рядом исследований. Получаемые при облучении микроорганизмов эффекты в дальнейшем могут явиться основой новых методов получения вакцин, увеличения продуктивности при получении антибиотиков. Однако, публикации, посвященные исследованию воздействия КВЧ-излучения на различные микроорганизмы, немногочисленны.

На современном этапе развития науки многие ученые поддерживают идею о том, что основной формой существования микроорганизмов является биопленка, когда микроорганизмы прикрепляются к поверхности, с последующим образованием биополимерного матрикса и развитием межклеточных коммуникаций [7-9]. В биопленках обмен информацией происходит с помощью специализированных сигнальных молекул, благодаря чему микробное сообщество работает как единый организм [7, 9]. При этом микроорганизмы, входящие в состав биопленок, как правило, резистентны к противомикробным средствам, обладают способностью противодействовать факторам иммунной защиты и характеризуются способностью к обмену информацией между клетками и коллективной координацией экспрессии генов [7]. Описанные данные во многом объясняют патогенез формирования бактерионосительства и хронических форм инфекционных процессов [7-9]. Поэтому, в последние годы, особое внимание уделяется, как способности микроорганизмов образовывать биопленки, так и факторам, влияющим на указанный процесс.

В свете вышеизложенного огромное значение приобретает исследование влияния электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на способность возбудителей дифтерии к образованию биопленок.

Цель исследований

Изучить способность патогенных коринебактерий к образованию биопленок под влиянием электромагнитного излучения частотных диапазонов 42,2 ГГц и 61,0 ГГц.

Материал и методы исследования

В качестве тест-культур использовали штаммы патогенных коринебактерий *Corynebacterium diphtheriae* (n=8). Суспензии тест-культур микроорганизмов готовили в соответствии со стандартом мутности по шкале McFarland с помощью прибора Densi-La-Meter (Lachema, Чехия) и доводили до оптической плотности 1,0 единица по шкале McFarland согласно инструкции к прибору. Синхронизацию культур проводили с помощью действия низкой температуры.

Для облучения суспензий микроорганизмов электромагнитным полем в узких полосах частот (квазигармонический сигнал) КВЧ-диапазона использовались генераторы сигналов Г4-141 ($f_1 = 37,5-53,57$) ГГц и Г4-142 ($f_2 = 53,57-78,33$) ГГц. Пробирки с культурами при комнатной температуре, без перемешивания, располагали вблизи от отверстия прямоугольного рупора с сечением 6,0-5,0 см (для генератора Г4-141) и 8,5-6,5 см (для генератора Г4-142). Во время облучения электромагнитным полем объекты находились на расстоянии $L \approx 5-7$ см от плоскости апертуры, то есть в ближней зоне антенны. В месте их расположения плотность потока мощности (ППМ) достигала величин $\sim 0,1$ мВт/см² при неравномерности облучения в месте расположения объектов в пределах 3 дБ, что связано со спецификой ближней зоны, конечными размерами апертуры и облучаемых объектов, а также низким импедансом нагрузки. Тест-культуры патогенных коринебактерий обрабатывали электромагнитным полем в частотных диапазонах 42,2 ГГц и 61,0 ГГц, при этом экспозиция воздействия составляла 3 часа.

Определение способности микроорганизмов к образованию биопленок проводили с использованием полистирольных микротитровальных планшетов по методике, описанной *Stepanovic* и др. в авторской модификации [10].

Штаммы патогенных коринебактерий выращивали в течение 18-24 часов на питательном агаре, содержащем 20% лошадиной сыворотки. Затем готовили взвесь культур микроорганизмов в стерильном физиологическом растворе с оптической плотностью 1,0 единица по шкале MacFarland. Приготовленные образцы бактериальных суспензий разводили (1:10) в стерильном 1% сахарном бульоне, (конечная микробная нагрузка составляла 3×10^7 КОЕ/мл) и добавляли по 200 мкл каждого образца в лунки полистироловых планшетов в трех повторах. В качестве негативного

контроля в три лунки полистироловых планшетов добавляли только 200 мкл стерильного питательного бульона, содержащего 1% глюкозы.

Планшеты инкубировали при 37°C в течение 24 часов, затем содержимое лунок отсасывали, каждую лунку промывали трижды стерильным физиологическим раствором. Планшеты интенсивно встряхивали, чтобы удалить все неадгезированные бактерии. После просушивания на воздухе, для окраски сформировавшихся биопленок в лунки планшета добавляли по 200 мкл 0,1% кристаллического фиолетового и оставляли на 15 мин. Затем каждую лунку промывали три раза стерильной дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Краситель, связанный с адгезированными клетками, экстрагировали в течение 30 мин, добавляя по 200 мкл 96% этанола в лунки планшет.

Оптическую плотность биопленок измеряли на спектрофотометре (Stat Fax) при длине волны 492 нм. Исходя из оптической плотности образцов (ОПо) и средней оптической плотности отрицательного контроля (ОПк), по способности к биопленкообразованию штаммы были разделены на группы: с сильной ($4 \times \text{ОПк} < \text{ОПо}$), умеренной ($2 \times \text{ОПк} < \text{ОПо} \leq 4 \times \text{ОПк}$), слабой ($\text{ОПк} < \text{ОПо} \leq 2 \times \text{ОПк}$) способностью к образованию биопленок или такие, которые не способны к биопленкообразованию ($\text{ОПо} \leq \text{ОПк}$).

Каждый эксперимент проводили минимум в трех повторах. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета анализа данных Statistica-8. Для оценки достоверности различий в показателях использовали непараметрические критерии: критерий Вилкоксона и критерий знаков. Достоверность различий относительных величин оценивали с помощью критерия χ -квадрат.

Результаты исследования и их обсуждение

На сегодняшний день способность возбудителей дифтерии к образованию биопленок практически не изучена, несмотря на тот факт, что указанная способность является определяющим фактором для реализации первого этапа инфекционного процесса (прикрепления возбудителя в месте внедрения в макроорганизм) а также дальнейшего развития инфекционного процесса.

При исследовании способности тест-культур патогенных коринебактерий к образованию биопленок до воздействия физических факторов установлено, что у 12,5 % исследованных штаммов образование стойких биопленок на полистирольных планшетах не наблюдалось, слабой способностью к биопленкообразованию обладали 12,5 % тест-культур и по 37,5 % штаммов характеризовались средним и высоким уровнем биопленкообразования (рис. 1).

Обработка тест-культур патогенных коринебактерий электромагнитными полями миллиметрового диапазона приводила к изменениям их способности к биопленкообразованию. Следует отметить, что направленность изменений зависела от частотного диапазона физического фактора, применявшегося для облучения.

Установлено, что КВЧ-волны в частотном диапазоне 61,0 ГГц оказывали стимулирующее воздействие на биопленкообразующие способности коринебактерий. При этом, как видно из рис. 1, доля штаммов, обладающих высокой способностью к формированию биопленок, возросла в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Средние показатели оптической плотности сформированных биопленок достоверно превышали контрольные в 1,6 раз (табл. 1).

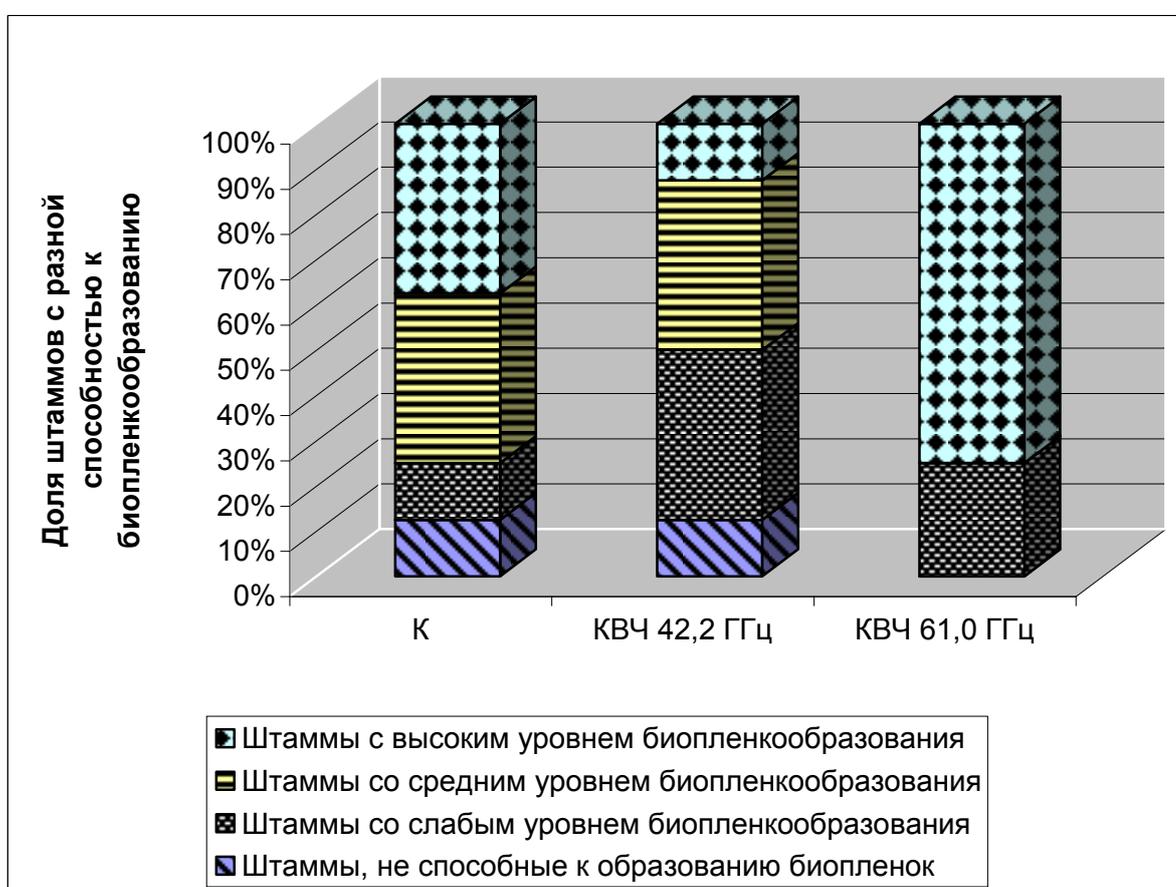


Рис. 1 – Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на способность патогенных коринебактерий к образованию биопленок

Таблица 1 – Оптическая плотность биопленок тест-культур коринебактерий при облучении электромагнитными волнами КВЧ-диапазона

Показатели оптической плотности биопленок, образованных патогенными коринебактериями, усл. ед., $M \pm m$		
Контроль	КВЧ 42,2 ГГц	КВЧ 61,0 ГГц
0,074±0,01	0,058±0,01	0,108±0,02*

* - разница достоверна по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Обратный эффект отмечен после воздействия на коринебактерии ЭМП частотного диапазона 42,2 ГГц. Указанный режим обработки приводил к тому, что доля штаммов с высокой способностью образовывать биопленки снизилась с 37,5 % до 12,5 % ($p < 0,05$), а с низкой, наоборот – увеличилась (рис. 1). При сравнении показателей оптической плотности биопленок коринебактерий, сформировавшихся после обработки ЭМП в вышеуказанном частотном диапазоне, и контрольных образцов выявлена лишь тенденция к снижению данного показателя (табл. 1).

Рассматривая механизмы влияния ЭМП на субклеточном уровне, необходимо отметить работы, в которых показано, что энергия электромагнитных облучений может быть использована для активного транспорта ионов через мембрану. Это происходит когда циклический перенос зарядов в трансмембранном ферменте совпадает по фазе с внешним осциллирующим полем. В этом случае наблюдается поглощение энергии электромагнитного поля ферментом и превращение ее в химическую энергию благодаря переносу ионов против градиента концентрации и синтеза АТФ. Все это приводит к изменению ферментативной активности клетки.

Шахбазовым В.Г. (1991 г.) была выдвинута гипотеза о функционировании ядерного генома, согласно которой ядро клетки является генератором высокоупорядоченных акустических и электромагнитных излучений в клетке и за ее пределами. Энергией, питающей биосцилляторы ядра, является тепловая энергия. Облучения ядерного генератора обуславливают формирование ядерного биоэлектрического потенциала, участвуют в регуляции ядерно-плазменного обмена и динамических процессах клетки. В связи с вопросами биологических эффектов микроволновых излучений это предположение дает широкое поле для эксперимента и анализа. Внешнее микроволновое излучение должно вступать в сложные взаимоотношения с ядерным генератором клетки или его аналогом, благодаря чему так много неоднозначных и сложных интерпретаций биологических эффектов воздействия ЭМП. Зачастую эмпирически подобранные режимы облучения дают положительные эффекты.

Среди систем регуляции, основанных на конформационных изменениях, а, следовательно, и изменениях концентрации реагентов, можно выделить две, которые имеют различные структурные элементы, но одинаковый принцип - метаболическую и гормональную. Метаболическая система регуляции основана на изменении функциональной активности ферментов. Энергия активации окислительно-восстановительных ферментативных реакций с участием ферментов в переносе электронов (биологически важный сигнал) связывается с субъединицей своего специфического белка-рецептора, в результате чего возрастает активность последнего. Это обеспечивает рецептору возможность взаимодействия с белком, который активирует ферменты-эффекторы; а они, в свою очередь, индуцируют появление большего количества внутриклеточных мессенджеров, в результате чего происходит многократное усиление сигнала. Существует предположение, что влияние микроволн служит пусковым фактором смещения концентрации одного из соединений (регуляторов) до уровня, определяющего активизацию того или иного фермента [1, 3-6].

Выводы

Способность к образованию биопленок выявлена у 87,5 % тест-культур коринебактерий. При этом по 37,5 % штаммов обладали средним и высоким уровнем биопленкообразования.

Миллиметровые волны в частотном диапазоне 61,0 ГГц оказывали стимулирующее влияние на способность патогенных коринебактерий к образованию биопленок.

При исследовании воздействия ЭМП частотного диапазона 42,2 ГГц на биопленкообразование тест-культур коринебактерий отмечено угнетение изучаемого признака.

Поскольку основным механизмом, обеспечивающим персистенцию бактерий, в том числе и возбудителей инфекционных заболеваний, является способность микроорганизмов к адгезии и образованию биопленок, исследования, связанные с поиском методов влияния на указанные свойства, являются перспективными. В связи с этим фактом, влияние электромагнитных полей миллиметрового диапазона на микроорганизмы требует более глубокого и всестороннего изучения.

Список литературы

1. Девятков, Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О.В. Особенности медико – биологического применения миллиметровых волн // М.,: Изд – во ИРЭ РАН, 1994. – 164 с.

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

Spisok literatury

1. Devyatkov, N. D., Golant M. B., Beckij O.V. Osobennosti mediko – biologicheskogo primeneniya millimetrovyykh voln // М.,: Izd – vo IRE' RAN, 1994. – 164 s.
2. Kryazhev D. V., Smirnov V.F. Novye aspekty primeneniya nizkointensivnykh izluchenij (KVCh) v e'kobiotechnologii // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo, 2010. – № 2. – s. 418-422.
3. Kudryashov, Yu. B., Ismailov E'. Sh., Zubkova S. M. Biologicheskie osnovy dejstviya mikrovoln (uchebnoe posobie) // М. : Izd-vo Mosk. Unta, 2002. – 159 s.
4. Sit'ko, S. P., Mkrтчyan L. N. Vvedenie v kvantovuyu medicinu //К.: Panteon, 2004. – 147 s.

5. Adey W. R. Tissue interaction with no ionizing electromagnetic fields // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol.61, № 2. – P. 435-514.
6. Blinowska, K. J., Lech W., Wittlin A. Membranes as a Possible Site of Frolics Coherent Oscillations // *Phys. Letters.* – 2005. – Vol. 109A, №3. - P. 124-126.
7. Cortes, M. E., Bonilla J. C., Sinisterra R. D. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication // *J. FORMATEX.* – 2011. – P. 896-905.
8. Mah, Thien-Fah C., O'Toole George A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents // *J. Microbiology.* – 2001. - V. 9, № 1 January. P. – 34- 39.
9. Myszka K., Czaczyk K. Mechanisms Determining Bacterial Biofilm Resistance to Antimicrobial Factors // *Antimicrobial Agents.* - P. 213-238.
10. Rodrigues L. B., Santos L. R., Tagliari V. Z., Rizzo N. N. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse // *Brazilian Journal of Microbiology.* – 2010. - V. 41. – P. 1082-1085.