

УДК 614.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ПЯТИОКИСИ ВАНАДИЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

© 2016 С.В. Поспелова¹, Э.С. Горовиц¹, И.О. Коршунова², А.В. Кривцов³¹Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А. Вагнера²Пермский государственный национальный исследовательский университет³Федеральный научный центр медико-профилактических технологий

управления рисками здоровью населения», г. Пермь

Статья поступила в редакцию 10.11.2016

Обсуждается воздействие влияния суббактериостатических концентраций пятиокиси ванадия на морфометрические характеристики двух культур *S.aureus*, изолированных от детей, проживающих в экологически чистом районе и районе, загрязненном выбросами металлургического завода. С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано, что исходные штаммы практически не отличаются по размерам, высоте и шероховатости поверхности клеток. Под влиянием V_2O_5 происходит изменение этих морфометрических характеристик. Изменения наиболее выражены у штамма, изолированного от ребенка, проживающего в экологически чистом районе. В большей мере увеличивается размер клеток.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, стафилококковое бактерионосительство, *S.aureus*, техногенное загрязнение, пятиокись ванадия

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является перспективным методом исследования особенностей поверхности бактериальных клеток различных таксономических групп и может применяться для решения фундаментальных и практических задач биологии и медицины [2, 7, 12]. АСМ позволяет получить изображения бактериальных клеток и их поверхности с высоким разрешением. Эти изображения применяются не только для анализа внешнего вида, но и характера поверхности бактериальных клеток. Она может быть использована для исследования морфологических изменений живых бактерий под действием самых разнообразных физиологических и экзогенных факторов. В частности, теплового воздействия [5], pH [13] и относительной влажности среды [17], а так же органических растворителей [3], нитрилов карбоновых кислот [4] и др.

Известно, что у микроорганизмов, выделенных с территорий, загрязненных выбросами металлургических заводов, отмечаются изменения их некоторых морфологических характеристик. В ряде экспериментальных работ получены аналогичные данные о влиянии металлов:

железа, меди, никеля, цинка, кадмия, кобальта на морфометрические показатели бактерий [9, 11, 14-16]. Однако подобное действие пятиокиси ванадия практически не изучено [10], тогда как он достаточно часто присутствует в выбросах металлургических предприятий [6] и относится к I классу опасности [1]. В этой связи можно полагать, что в условиях длительного бактерионосительства у лиц, проживающих на территориях, загрязненных отходами металлургического производства, длительное воздействие пятиокиси ванадия на штаммы *Staphylococcus aureus* будет влиять на морфометрические характеристики стафилококков.

Цель работы: сравнительное изучение влияния пятиокиси ванадия на морфометрические показатели двух культур *S.aureus*, изолированных из полости носа детей, проживающих соответственно в промышленном и экологически благополучном районах.

Материалы и методы. В результате бактериологического обследования на стафилококковое бактерионосительство двух групп детей в возрасте 5-7 лет, проживающих в районах загрязнения металлополлютантами и в экологически чистом, были выделены и отобраны для последующего исследования два штамма *S.aureus*, соответственно – №451 (из района, прилегающего к металлургическому заводу) и №792 (экологически чистый район). Изучаемые штаммы культивировали 18 часов в LB-бульоне с раствором пятиокиси ванадия в субингибирующей концентрации – 0,00375 мг/мл. В качестве контроля использовали

Поспелова Светлана Валерьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики. E-mail: pospelova_svetlana@mail.ru

Горовиц Эдуард Семенович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики

Коршунова Ирина Олеговна, ассистент

Кривцов Александр Владимирович, заведующий лабораторией иммуногенетики

эти же штаммы, выращенные в LB-бульоне. В последующем культуры трижды отмывали физиологическим раствором 20 000 g в течение 15 мин.

Сканирование клеток осуществляли с помощью атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D (Asylum Research, США) на базе кабинета микроскопии Пермского государственного национального исследовательского университета. Использовали кантилевер AC240TS, размер сканирования – 10-14 мкм. Обработку полученных данных проводили с помощью программ Excel и STATISTICA 6.1 [8]. Оценку размеров клеток, шероховатости их поверхности осуществляли с использованием средних арифметических величин (M) и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Поскольку по критерию Шапиро-Уилкса распределение признаков было нормальным (гауссовым), сравнение показателей двух штаммов *S.aureus* проводили с помощью критерия Стьюдента (t). О статистически значимых различиях полученных результатов в сравниваемых группах судили по величине цифровых значений p , критический уровень значимости которого в данном исследовании принимался равным 0,05.

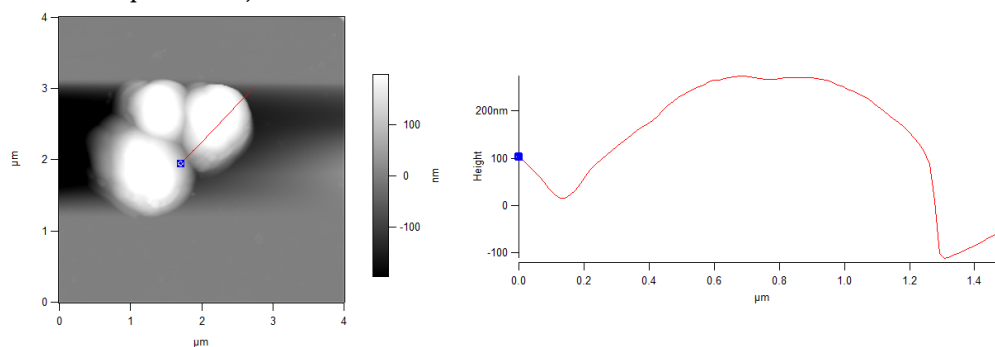


Рис. 2. Профиль штамма *S.aureus* №451

Средние значения размеров клеток штамма *S.aureus* № 792 (культура сравнения), изолированного из полости носа ребенка, проживающего на экологически благоприятной территории, практически не отличались от предыдущего штамма №451 и составили $1,01 \pm 0,06$ мкм (рис. 3). Анализ профиля клеток показал, что высота их составила так же около 400 нм (рис. 4). Таким образом, средние значения диаметра и высоты клеток *S.aureus* в стационарной фазе роста вне зависимости от экологических условий территорий, на которых проживают бактерионосители данных штаммов, практически одинаковы.

В серии специальных экспериментов изучено влияние пятиокиси ванадия на морфометрические характеристики этих же культур после 18-часового воздействия суббактериостатической концентрации. Под его влиянием средний диаметр клеток штамма *S.aureus* №451 увеличился до $1,18 \pm 0,1$ мкм. При этом если в контроле культура имела упругую клеточную стенку с четкими

Результаты исследования. Культура *S.aureus* №451, изолированная из полости носа ребенка, проживающего в зоне выбросов металлургического завода, образовывала типичные скопления в виде гроздьев винограда (рис. 1). Средние размеры клеток *S.aureus* №451 в диаметре составили $0,97 \pm 0,23$ мкм, их высота колебалась от 400 до 420 нм (рис. 2).

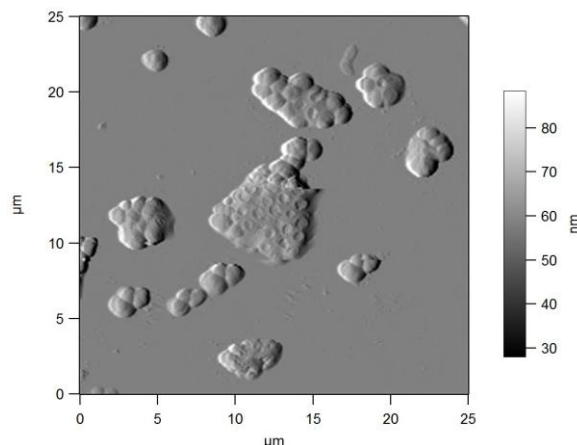


Рис. 1. АСМ штамма *S.aureus* №451 в стационарной фазе роста

контурами (рис. 1), то после воздействия пятиокиси ванадия клеточная стенка теряла упругость, кантилевер «залипал», цеплялся за поверхность клеток и на изображении появлялись точки по контуру клеток (рис. 5).

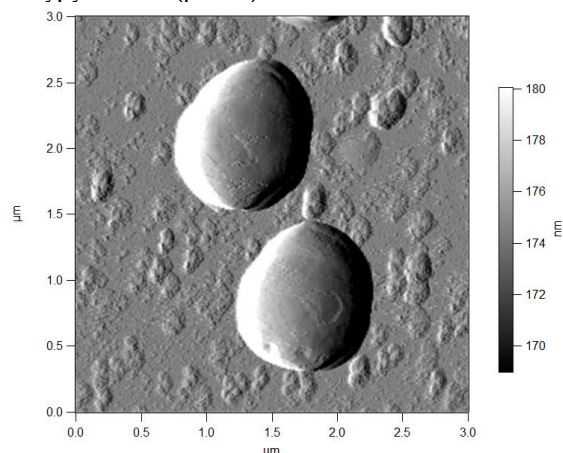
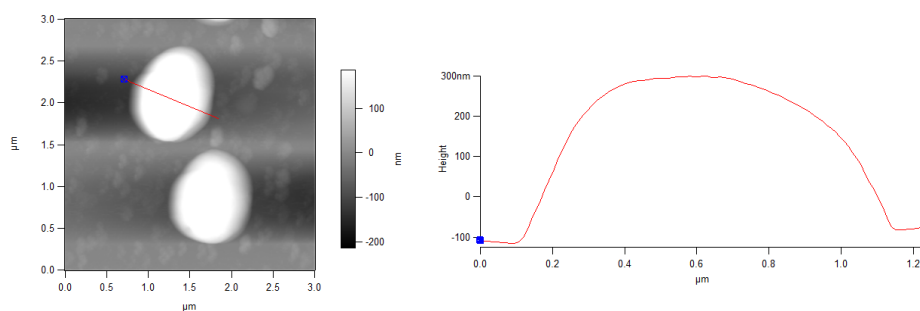
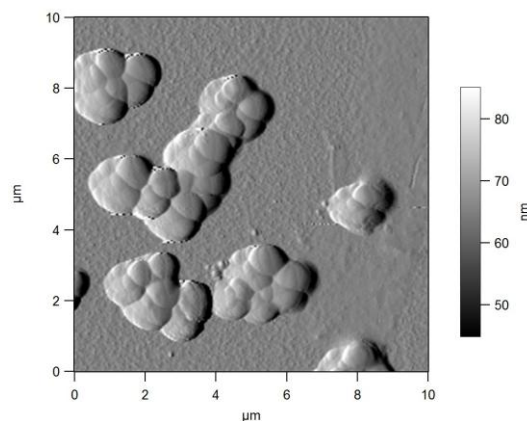
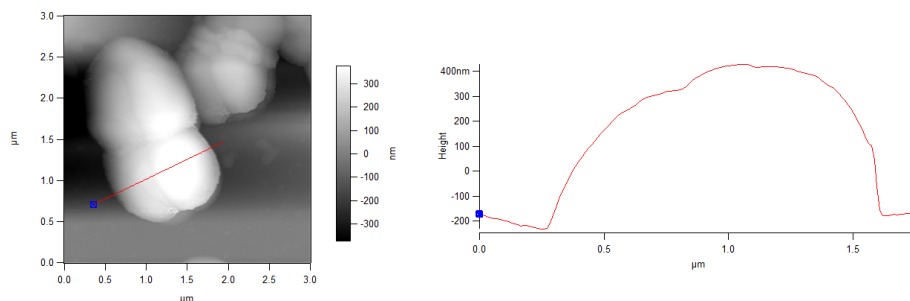
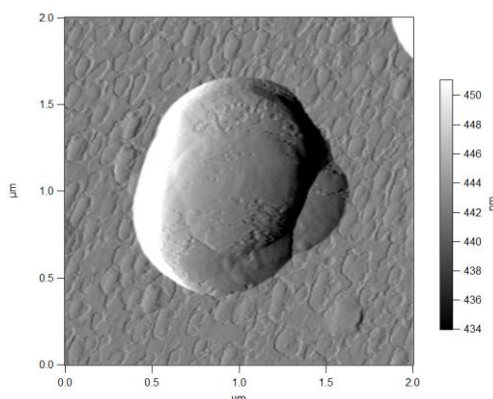


Рис. 3. АСМ штамма *S.aureus* №792 в стационарной фазе роста

Рис. 4. Профиль культуры *S.aureus* №792

Увеличилась и высота клеток до 600-610 нм против 400-420 в контроле (рис. 6). Под воздействием V_2O_5 на штамм *S.aureus* № 792 установлено, что размеры его клеток статистически значимо увеличились от $1,01 \pm 0,06$ мкм до $1,16 \pm 0,06$ мкм (рис. 7). В то же время, высота клеток штамма *S.aureus* № 792 под влиянием пятиокиси ванадия снизилась до 320 нм (рис. 8).

Шероховатость поверхности клеток штамма *S.aureus* №451, так же, как и штамма *S.aureus* №792 после 18-часовой инкубации с суббактериостатической концентрацией пятиокиси ванадия несколько увеличилась. Полученные цифровые данные средних значений показателей, характеризующие влияние пятиокиси ванадия на диаметр клеток и их шероховатость суммированы в табл. 1.

Рис. 5. АСМ штамма *S.aureus* №451 после 18-часового воздействия пятиокиси ванадия в суббактериостатической концентрацииРис. 6. Профиль культуры *S.aureus* №451, после 18-часового воздействия пятиокиси ванадия в суббактериостатической концентрацииРис. 7. АСМ штамма *S.aureus* №792 после 18-часового воздействия пятиокиси ванадия в суббактериостатической концентрации

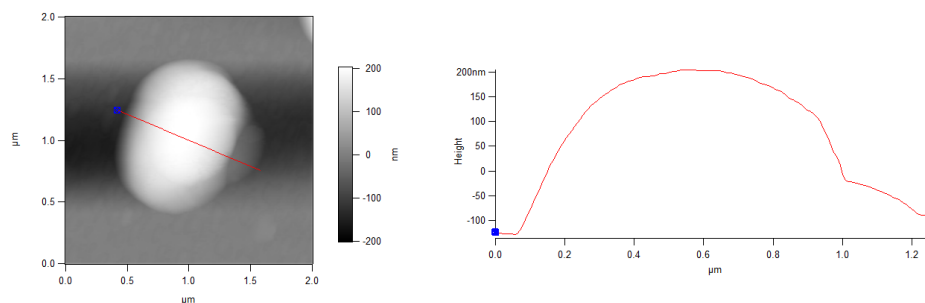


Рис. 8. Профиль культуры *S.aureus* №792 после 18-часового воздействия пятиокси ванадия в суббактериостатической концентрации

Таблица 1. Основные морфометрические критерии сравниваемых штаммов *S.aureus*

Критерии	<i>S.aureus</i> № 451			<i>S.aureus</i> № 792		
	исходные показатели, $M \pm SD$	после воздействия V_2O_5 , $M \pm SD$	p	исходные показатели, $M \pm SD$	после воздействия V_2O_5 , $M \pm SD$	p
размер клеток (диаметр), мкм	$0,97 \pm 0,23$	$1,18 \pm 0,1$	$>0,05$	$1,01 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,06$	$<0,05$
шероховатость поверхности, нм	$281 \pm 86,1$	$321,8 \pm 74,7$	$>0,05$	$268,8 \pm 37,9$	$310,9 \pm 61,4$	$>0,05$

Выводы: 18 часовое воздействие суббактериостатической концентрации V_2O_5 приводит к статистически значимому увеличению размеров клеток *S.aureus* №792, при снижении их высоты. В отношении штамма *S.aureus* №451, выделенного от резидентного носителя, проживающего в условиях хронического аэрогенного внешнесредового воздействия выбросов металлургического завода, такие закономерности не выявлены. Можно полагать, что длительное воздействие металлополлютантов на штамм *S.aureus* №451 привело к адаптации бактерий к этим соединениям. Как следствие, пятиокись ванадия на эти характеристики бактерий влияла незначительно. Выявленные различия в отношении шероховатости поверхности клеток *S.aureus* под влиянием пятиокси ванадия не были статистически значимы в сравнении с исходными показателями, однако все-таки прослеживалась тенденция к увеличению этого признака. Таким образом, V_2O_5 в большей мере влияет на размер клеток, особенно существенно это влияние на штамм, выделенный от бактерионосителя, проживающего в экологически чистом районе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества Классификация и общие требования безопасности. Дата введения 1977-01-01
- Дерябин, Д.Г. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии / Д.Г. Дерябин, А.С. Васильченко, Е.С. Алешина и др. // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. №11–12. С. 103–108.
- Коршунова, И.О. Влияние органических растворителей на морфофункциональные и наномеханические свойства родококков. Автореферат дисс. на соискание уч. степ. к.б.н. - Пермь, 2016. 27 с.
- Максимова, А.В. Влияние синтетических нитрилов на почвенные микроорганизмы Автореферат дисс. на соискание уч. степ. к.б.н. – Пермь, 2016. 23 с.
- Олюнина, Л.Н. Оценка терморезистентности *Azotobacter chroococcum* методом атомно-силовой микроскопии / Л.Н. Олюнина, Ю.А. Мацкова, Т.А. Гончарова, Ю.Ю. Гуцина // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, №1. С. 45–50.
- Поспелова, С.В. Влияние техногенной нагрузки на видовой состав и особенности биопленкообразования стафилококков, изолированных от бактерионосителей / С.В. Поспелова, Э.С. Горовиц, Л.М. Лемкина // Экология человека. 2014. №5. С. 48–52.
- Потатуркина-Нестерова, Н.И. Атомно-силовая микроскопия как метод исследования в микробиологии / Н.И. Потатуркина-Нестерова, И.С. Немова, А.В. Данышина // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=6348> (дата обращения: 07.06.2016).
- Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Медиа Сфера, 2006. 313 с.
- Чекнев, С.Б. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* катионами меди и цинка, примененными в физиологических концентрациях / С.Б. Чекнев, Е.И. Вострова, М.А. Сарычева, А.В. Востров // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2016. №3. С. 9–18.
- Cohen, M.D. Effects of Metal Compounds With Distinct Physicochemical Properties on Iron Homeostasis and Anti-Bacterial Activity in the Lungs: Cr and V / M.D. Cohen, M. Sisco, C. Prophete et al. // Inhal Toxicol. 2010 February. V. 22(2). P. 169–178.

11. Corbin, B.D. Metal helashion and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses / B.D. Corbin, E.H. Seeley, A. Raah et.al. // Science. 2008. V. 319 (15). P. 962-965.
12. Esfandiary, E. The evaluation of toxicity of carbon nanotubes on the human adipose derived stem cells in vitro / E. Esfandiary, A. Valiani, B. Hashemibeni et al. // Advanced Biomedical Research. 2014. V. 3.
13. Gaboriaud, F. Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy / F. Gaboriaud, S. Bailet, E. Dague, F. Jorand // Journal of bacteriology. 2005. V. 187, №11. P. 3864-3868.
14. Hammer, N.D. The impact of metal sequestration on *Staphylococcus aureus* metabolism / N.D. Hammer, E.P. Skaar // Curr. Opin. Microbiol. 2012 February. V. 15(1). P. 10-14.
15. Cassat, J.E. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity (Iron; Manganese; Zinc; Copper) / J.E. Cassat, E.P. Skaar // Semin Immunopathol. 2012 March. V. 34(2). P. 215-235.
16. Nies, D.H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes // Plasmid. 1992 Jan. V. 27(1). P. 17-28.
17. Nikiyan, H. Humidity-dependent bacterial cells functional morphometry investigations using atomic force microscope / H. Nikiyan, A. Vasilchenko, D. Deryabin // International Journal of Microbiology. 2010.

USE THE ATOMIC AND POWER MICROSCOPY FOR ASSESSMENT THE INFLUENCE OF VANADIUM PENTOXIDE ON MORPHOMETRIC PARAMETERS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS

© 2016 S.V. Pospelova¹, E.S. Gorovits¹, I.O. Korshunova², A.V. Krivtsov³

¹ Perm State Medical University named after acad. E.A. Wagner

² Perm State National Research University

³ Federal Scientific Center of Medical Preventive Technologies of Risk Management
to Health of the Population

Impact of influence the subbacteria static concentration of vanadium pentoxide on morphometric characteristics of two cultures of *S.aureus* isolated from the children living in the environmentally friendly area and in the area polluted by emissions of steel works is discussed. By means of the atomic and power microscopy (APM) it is shown that initial strains practically do not differ by the sizes, height and roughness of cells surface. Under the influence of V₂O₅ there is a change of these morphometric characteristics. Changes are most expressed at the strain isolated from the child, living in the environmentally friendly area. To a large extent the size of cells increases.

Key words: *atomic and power microscopy, staphylococcal bacteria carrier, S.aureus, technogenic pollution, vanadium pentoxide*

Svetlana Pospelova, Candidate of Medicine, Associate Professor
at the Department of Microbiology and Virology with the
Course of Clinical Laboratory Diagnostics. E-mail:
pospelova_svetlana@mail.ru

Eduard Gorovits, Doctor of Medicine, Professor, Head of the
Department of Microbiology and Virology with the Course of
Clinical Laboratory Diagnostics

Irina Korshunova, Assistant

Alexander Krivtsov, Chief of the Immunogenetics Laboratory