



7. Richardson D. M., Pyšek P., Rejmanek M., Barbour M. G., Dane Panetta F., West C. J. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions // Diversity and distributions. 2000. № 6. P. 93–107.
8. Reinhart K. O., Greene E., Gallaway R. M. Effects of Acer platanoides invasion on understory plant communities and tree vegetation in the Rocky Mountains // Ecography. 2005. Vol. 28. P. 573–583.
9. Rejmanek M., Richardson D. M., Pyšek P. Plant invasions and invisibility of plant communities // Vegetation ecology. Oxford: Blackwell, 2005. P. 332–355.
10. Pyšek P., Prach K. Research into plant invasions in a cross-roads region: History and focus // Biological Invasions. 2003. Vol. 5. P. 337–348.
11. Pyšek P., Richardson D. M. The biogeography of naturalization in alien plants // J. Biogeogr. 2006. Vol. 33. P. 2040–2050.
12. Тимухин И. Н. Флора сосудистых растений Сочинского национального парка // Инвентаризация основных таксономических групп и сообществ, соэологические исследования Сочинского национального парка – первые итоги первого в России национального парка / под ред. Б. С. Туниева. М.: Престиж, 2006. С. 41–84.
13. Маренчук Ю. А. Адвентивный элемент флоры Центрального Предкавказья // Фундаментальные исследования. 2009. № 3. С. 50–51.
14. Серегин А. П., Шведчикова Н. К. Дополнения к флоре Северо-Западного Кавказа // Бюл. МОИП. Отд-ние биол. 2009. Т. 114, вып. 3. С. 62–63.
15. Зернов А. С. Иллюстрированная флора юга Российского Причерноморья. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2013. 588 с.

УДК 577.344.3

ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНОГО СИНЕГО (405 нм) ИЗЛУЧЕНИЯ И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (III) НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 209 P

Н. А. Шелест¹, Е. К. Волкова¹, К. В. Козина¹, М. В. Корченова¹,
Е. С. Тучина¹, А. М. Захаревич¹, В. И. Кочубей¹, В. В. Тучин^{1,2,3}

¹Саратовский государственный университет

²Институт проблем прецизионной механики и управления РАН, Саратов

³Университет Оулу, Финляндия

E-mail: kliany@rambler.ru



Изучено влияние светодиодного синего (405 нм) излучения в сочетании с оксидом железа III на бактерии *Staphylococcus aureus* 209 P. Показано, что синий (405 нм) свет в сочетании с наночастицами Fe₂O₃ обладал угнетающим действием: снижение численности исследуемых микроорганизмов отмечено на 88% после 30 мин воздействия. Методами атомно-силовой и электронной микроскопии установлено изменение морфологии клеток стафилококка при комплексном влиянии синего (405 нм) излучения и наночастиц Fe₂O₃, которое выразилось в уменьшении диаметра клеток на 100 нм и появлении внешнего фрагментированного слоя толщиной 71 нм.

Ключевые слова: синее (405 нм) излучение, микроорганизмы, *S. aureus*, наночастицы, оксид железа III.

The Action of Led Blue (405 nm) Light and Iron Oxide III Nanoparticles on Viability and Morphology of *Staphylococcus Aureus* 209 P

N. A. Shelest, E. K. Volkova, K. V. Kozina,
M. V. Korchenova, E. S. Tuchina, A. M. Zacharevich,
V. I. Kochubey, V. V. Tuchin

The main goal was to study the sensitivity of microorganisms to combined action of LED blue (405 nm) light and iron oxides

nanoparticles. In this study standard strain of *Staphylococcus aureus* 209 P was used. As blue light source LED with spectrum maxima at 405 nm was taken. The light exposure was ranged from 5 to 30 min. Fe₂O₃ nanoparticles in different concentrations were synthesized. It was shown that irradiation with blue light caused 20 to 88% decrease in the number of microorganisms treated with nanoparticles. Morphological changes in bacterial cells after photodynamic treatment were analyzed using atomic force microscope and scanning electron microscope.

Ключевые слова: blue (405 nm) light, microorganisms, *S. aureus*, nanoparticles, iron oxide III.

Введение

Золотистый стафилококк является одним из наиболее распространенных патогенов и возбудителем различных видов инфекционных заболеваний [1]. Последние десятилетия характеризуются возрастающей устойчивостью клинически значимых микроорганизмов, в том числе бактерий рода *Staphylococcus*, к различным антибактериальным препаратам [2]. В связи с этим необходим поиск альтернативных методов



лечения, к которым бактерии не смогут сформировать резистентность. Одним из наиболее перспективных в этом контексте представляется метод фотодинамической терапии.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является разновидностью химиотерапии, основанной на фотохимической реакции, катализатором которой является кислород, активированный взаимодействием кванта света с молекулой-фотосенсибилизатором [3–5].

Одним из ключевых условий успешного применения ФДТ является правильный подбор светочувствительного агента – фотосенсибилизатора или фотокатализатора. Известно, что наночастицы оксида железа III в присутствии света синей области спектра приобретают фотокаталитические свойства, т.е. стимулируют образование свободных радикалов и активных форм кислорода в окружающей среде [6–10]. Возникновение таких процессов поблизости от мембраны бактериальной клетки способно привести к ее повреждению и дальнейшей гибели [5, 6].

На основании вышесказанного целью данной работы явилось изучение эффективности влияния синего светодиодного излучения и наночастиц оксида железа III на бактерии *S. aureus* 209 P.

Материалы и методы

Объектами для исследования служил типовой штамм *Staphylococcus aureus* 209 P (ГИСК им. Л. А. Тарасевича, Москва). Микроорганизмы выращивали при температуре 37°C на универсальной плотной питательной среде (ГРМ-агар, Оболенск, Россия).

В качестве источника излучения использовали светодиод с длиной волны 405 нм (синее излучение – СИ) и плотностью мощности 70 мВт/см².

В качестве фотокатализатора были выбраны наночастицы Fe₂O₃ (НЧ) со средним диаметром 8 нм. В экспериментах использовали суспензии наночастиц в концентрациях 0.01, 0.1 и 1 мг/мл.

При постановке опытов работали с суточной бактериальной культурой. Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе; из разведения микроорганизмов 10⁵ мк/мл отбирали 0.1 мл взвеси и вносили в 0.9 мл стерильного водного раствора наночастиц, инкубировали в течение 15 мин времени без доступа света. Из конечного разведения, а также из раствора наночастиц взвесь в объеме 0.1 мл вносили в ячейки иммунологического полистирольного планшета. Источник излучения располагали над ячейками планшета.

Облучали бактериальные взвеси в течение 5, 10, 15 и 30 мин. После воздействия взвеси бактерий переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Учет результатов проводили путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24–72 ч после инкубации при 37°C. Контролем (100%) служили показатели КОЕ для взвесей бактерий, не обработанных наночастицами и не подвергнутых облучению. Каждый эксперимент проводили в десятикратной повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel 2010.

Поверхность и размер клеток *S. aureus* 209 P исследовали при помощи сканирующего зондового микроскопа Solver P47 с использованием зонда CSG 10. Все измерения проводились в полуконтактном режиме с регистрацией как профиля поверхности, так и фазы колебаний зонда. Обработку АСМ изображений проводили при помощи программного обеспечения Gwyddion.

Для изучения формы бактериальных клеток и характера внешних слоев использовали сканирующий электронный микроскоп MIRA//LMU (TESCAN, Чехия) с приставкой TEM. Измерения проводили в режиме регистрации вторичных электронов.

Для проведения микроскопических исследований культуру бактерий предварительно очищали от среды культивирования путем двукратного центрифугирования (9000 об/мин) с последующим разведением осадка стерильной дистиллированной водой. Забор проб осуществляли во время эксперимента по фотодинамическому воздействию. 10 мкл бактериальной взвеси помещали на покровное стекло и высушивали при комнатной температуре для анализа на атомно-силовом микроскопе. Для исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа образцы взвесей объемом 10 мкл помещали на кремниевые пластинки. Дегидратирование препаратов осуществляли путем погружения в водно-спиртовой раствор, последовательно увеличивая концентрацию этанола до 90%.

Результаты и их обсуждение

Одним из основных требований, предъявляемых к используемым фотосенсибилизаторам, является их низкая темновая токсичность. Для выявления данного параметра наночастиц Fe₂O₃ изучали их действие на *S. aureus* 209 P. Бактериальные взвеси инкубировали в растворах наночастиц с концентрациями 0.01, 0.1 и 1 мг/мл в течение 30 мин без доступа света, затем по-



мешали на чашки Петри с плотной питательной средой и инкубировали в течение суток при 37°C. Изменение численности бактерий оценивали путем подсчета числа КОЕ.

Было показано, что использование наночастиц в концентрации 0.01 мг/мл не приводит к достоверному снижению численности бактерий – число КОЕ после инкубации составляло 98% по сравнению с контролем. Сходные данные

были получены при исследовании наночастиц в концентрации 0.1 мг/мл – значение КОЕ было равно 96%. При использовании концентрации Fe_2O_3 1 мг/мл изменения были более выраженными – показатель КОЕ снизился до 90% (рис. 1). Для дальнейших исследований использовали все три концентрации наночастиц Fe_2O_3 , поскольку уровень темновой токсичности наночастиц не превышал 10%.

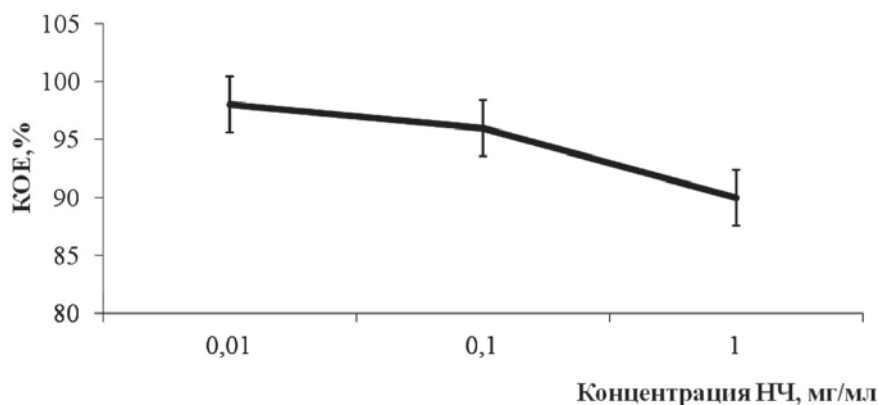


Рис. 1. Изменение численности *S. aureus* 209 P при различных концентрациях наночастиц Fe_2O_3

Известно, что при фотодинамическом воздействии важным условием генерации активных форм кислорода и свободных радикалов является пересечение спектра испускания источника излучения со спектром поглощения фотосенсибилизатора/фотокатализатора. Для прогнозирования эффективности воздействия с использованием синего (405 нм) излучения наночастиц оксида железа III измеряли оптическую плотность их водных суспензий в

концентрации 0.01 мг/мл. Измерения проводили с помощью спектрофотометра Lambda 950 (PerkinElmer Ink., USA). Спектры регистрировались при комнатной температуре при толщине кварцевой кюветы 10 мм. Установлено, что раствор наночастиц Fe_2O_3 в концентрации 0.01 мг/мл имеет максимум поглощения в области 320 нм (0.41 отн. ед.), при длине волны 405 нм оптическая плотность составляет 0.3 отн. ед. (рис. 2).

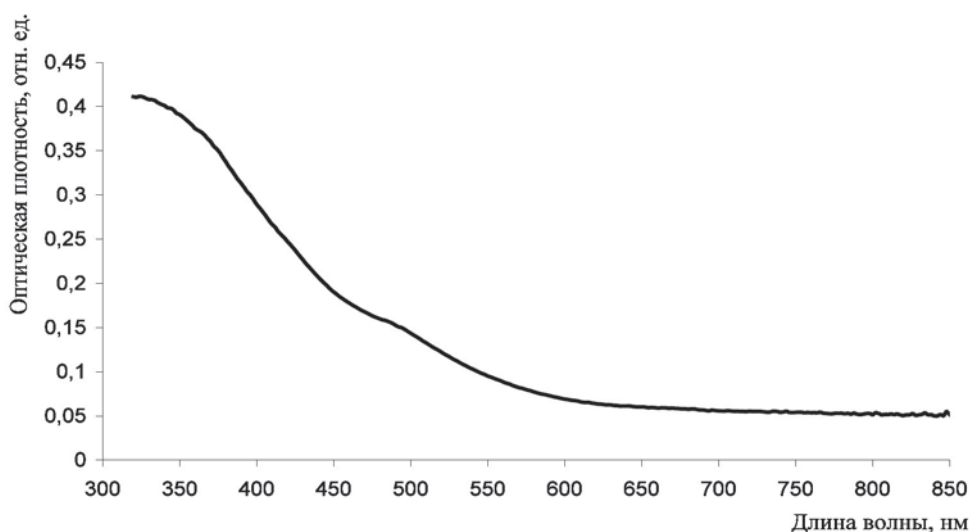


Рис. 2. Спектр оптической плотности водного раствора наночастиц Fe_2O_3 (0.01 мг/мл)



При воздействии синего светодиодного излучения на бактериальные взвеси выявлено снижение численности микроорганизмов. Через 5 и 10 мин облучения уровень числа КОЕ оставался

достаточно высоким – 88 и 73% соответственно. Существенное снижение выживаемости (до 61%) было отмечено через 15 мин после облучения. Через 30 мин число КОЕ составило 49% (рис. 3).

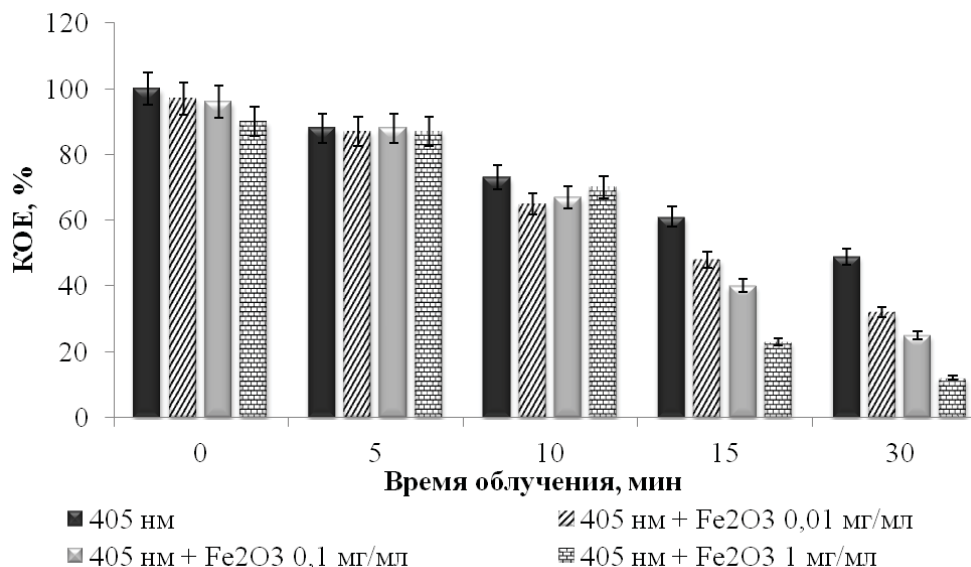


Рис. 3. Изменение численности *S. aureus* 209 P при воздействии синего (405 нм) светодиодного излучения и наночастиц Fe₂O₃

При использовании оксида железа III в концентрации 0.01 мг/мл показатели КОЕ через 5 мин облучения снижались незначительно. Через 10 мин уровень КОЕ составлял 65%, а через 15 мин – 48%, что соответствовало эффекту 30-минутного облучения без сенсibilизатора. Наиболее существенные показатели подавления численности (до 32%) были достигнуты через 30 мин облучения (рис. 3).

Схожие результаты были продемонстрированы при использовании оксида железа III в концентрации 0.1 мг/мл – до 10 мин облучения число КОЕ составляло 67%, и лишь через 15 и 30 мин облучения данный показатель снижался до 40 и 25% соответственно (см. рис. 3).

Наиболее эффективным оказалось применение наночастиц Fe₂O₃ в концентрации 1 мг/мл. Как и во всех остальных случаях, через 10 мин после облучения число КОЕ оставалось достаточно

высоким. Однако уже после 15 мин воздействия наблюдались значительные изменения – уровень выживаемости составил 23%. Через 30 мин действия синего излучения численность популяции сократилась до 12% от исходной.

На основании полученных данных для проведения микроскопических исследований были взяты образцы клеток стафилококков: 1) не подвергнутых облучению и не обработанных наночастицами (контроль); 2) обработанных наночастицами Fe₂O₃ в концентрации 1 мг/мл; 3) обработанных наночастицами Fe₂O₃ в концентрации 1 мг/мл и облученных синим (405 нм) светом в течение 30 мин.

По результатам микроскопии контрольных образцов бактерий установлено, что клетки *S. aureus* 209 P имеют сферическую форму и обладают однородной, шероховатой поверхностью (таблица).

Изменение морфологии клеток *S. aureus* 209 P при комбинированном действии синего (405 нм) излучения и наночастиц Fe₂O₃

Параметры клеток, нм	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> + Fe ₂ O ₃	<i>S. aureus</i> + 405 нм	<i>S. aureus</i> + 405 нм + Fe ₂ O ₃
Диаметр	1159.4±34.7	1181.26±35.4	1164.7±34.9	1022.1±35.1
Шероховатость	1.09±0.03	0.33±0.03	0.36±0.01	0.06±0.01
Толщина внешнего слоя	–	–	65.4±3.42	71.3±2.81



Средний диаметр клеток составлял 1.16 мкм. При изучении профиля поверхности бактерий выявлено, что средняя шероховатость поверхности бактериальной клетки составила 1.09 нм (рис. 4, 1).

Бактерии, инкубированные с наночастицами, обладали сферической формой и сглаженной поверхностью. На поверхности бактерий и за ее

пределами наблюдали правильные сферические частицы размерами 10–100 нм. Эти образования представляют собой наночастицы оксида железа III – как в одиночной форме, так и в виде конгломератов. Диаметр клеток составлял 1.18 мкм. Отмечено снижение значения средней шероховатости до 0.33 нм (см. рис. 4, 2).

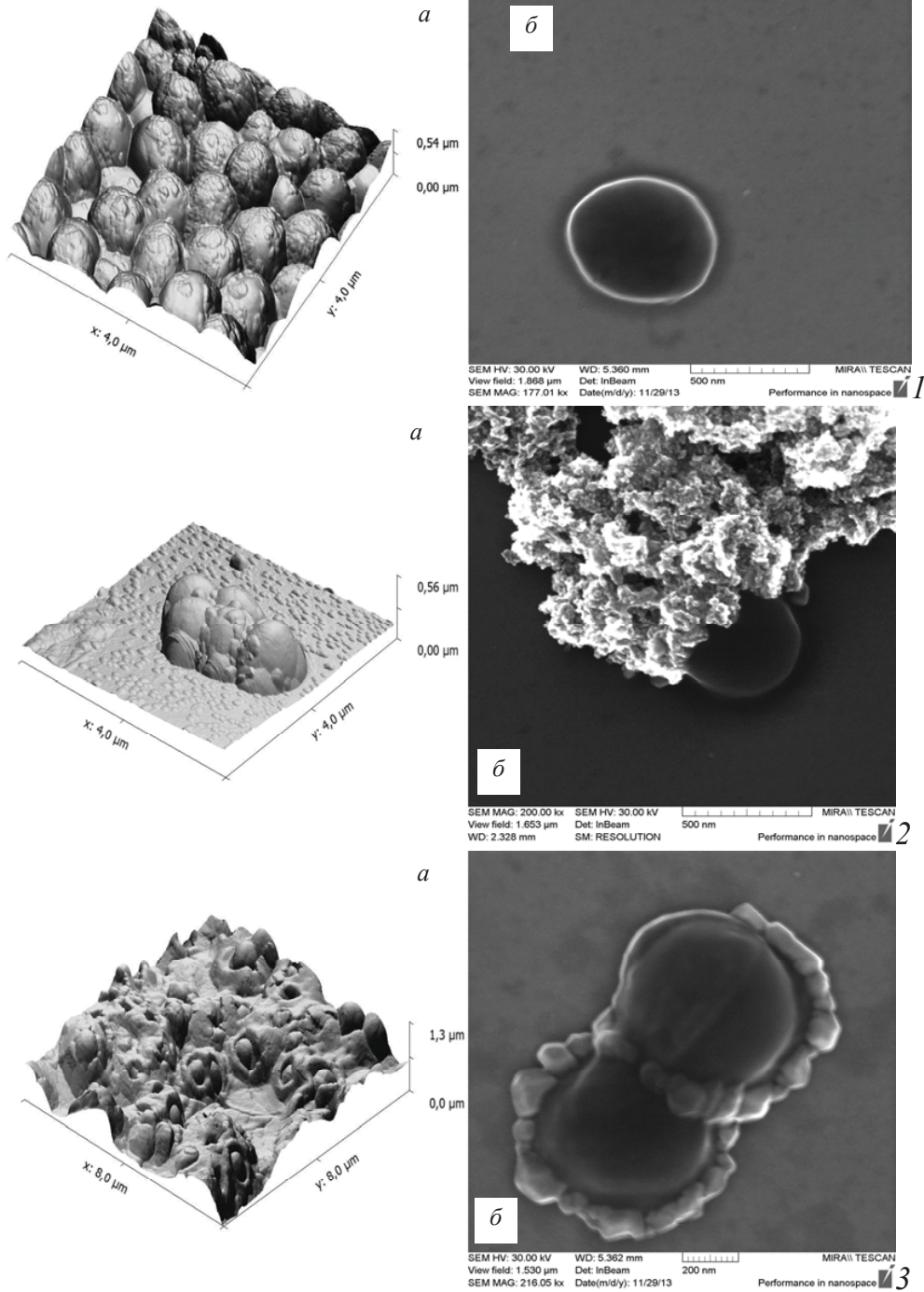


Рис. 4. Морфология поверхности необлученных клеток *S. aureus* 209 P (1); клеток *S. aureus* 209 P, инкубированных с наночастицами Fe₂O₃ (2); клеток *S. aureus* 209 P после 30 мин облучения синим (405 нм) светом (3); а – снимки на АСМ, б – снимки на СЭМ



Исследования структуры облученных бактерий выявили изменения клеточной поверхности. На микроскопических изображениях наблюдаются структуры толщиной порядка 65 нм, опоясывающие клетку. В частности, средняя шероховатость поверхности бактериальной клетки составила 0.36 нм. Средний диаметр клеток составлял 1.16 мкм (см. рис. 4, 3). Облученные бактерии по сравнению с необлученными образцами значительно чаще встречались в виде одиночных форм или небольших скоплений по 3–4 клетки, нежели в виде крупных кластеров. Как и в предыдущих образцах, наблюдались делящиеся формы бактерий.

По результатам исследования морфологии поверхности бактерий, подверженных действию

синего излучения с использованием наночастиц, было выявлено, что характер изменений бактериальной оболочки схож с изменениями, описанными у бактерий, подверженных действию света без фотосенсибилизатора.

Средний диаметр бактериальной клетки составлял 1 мкм, средняя шероховатость – 0.06 нм. Толщина структуры, опоясывающей клетку, составляла 71 нм. На изображении также видно, что наночастицы представляют собой конгломераты, как взаимодействующие с поверхностью бактерий, так и распределенные за ее пределами (рис. 5). Наиболее часто клетки располагались одиночно, встречались пары делящихся клеток или небольшие кластеры из 3–4 микробных клеток.

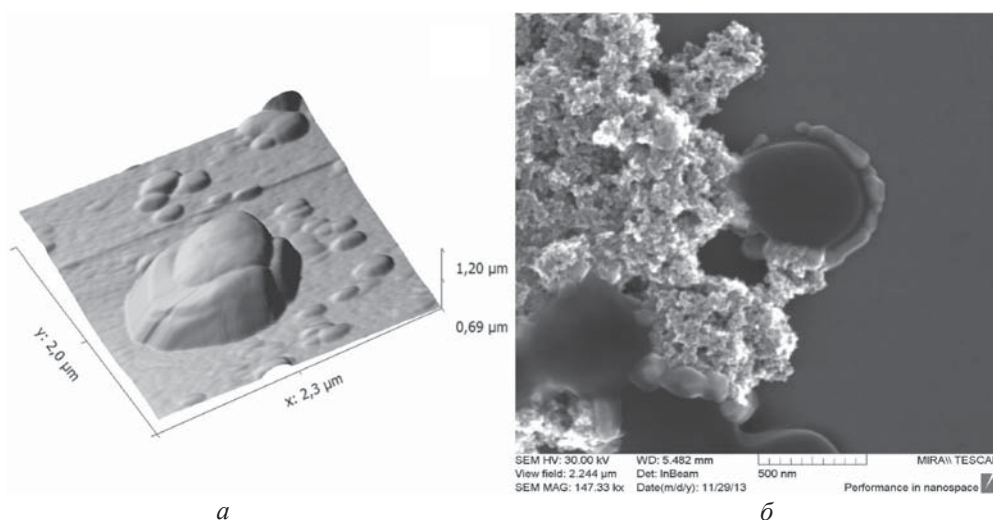


Рис. 5. Морфология поверхности бактерий *S. aureus* 209 P после обработки наночастицами и облучения синим (405 нм) светом в течение 30 мин; а – снимки на АСМ; б – снимки на СЭМ

Антибактериальная активность наночастиц оксида железа может объясняться несколькими механизмами. Прежде всего, бактериостатическое действие связывают с образованием активных форм кислорода в ходе реакции Фентона, повреждающих биологические структуры. Активные формы кислорода включают в себя супероксидные радикалы, гидроксидные радикалы и синглетный кислород, которые могут вызывать химическое повреждение белков и ДНК у бактерий [2, 3]. Также электростатическое взаимодействие между наночастицами и белками клеточных мембран может приводить к физическим повреждениям, в конечном итоге обуславливающим клеточную гибель.

Концентрация наночастиц оказывает существенное влияние на их антибактериальную активность. Известно, что оксид железа про-

являет хорошие бактериостатические свойства при максимальной концентрации 2 мг/мл [10, 11]. Угнетающее действие наночастиц оксида железа III известно как для грамположительных (*S. aureus*, *S. epidermidis*), так и для грамотрицательных (*E. coli*) бактерий [8–10].

Морфология поверхности бактериальной клетки отражает общие изменения метаболизма и жизненно важных параметров. Согласно литературным данным [12, 13] шероховатость поверхности может определять адгезивные свойства клеток, а также влиять на синтез специфических белков. В наших исследованиях показатель средней шероховатости снижался при увеличении экспозиции излучения и добавлении наночастиц, что может свидетельствовать о нарушении обмена веществ в клетке. Помимо этого, клетки в ходе повышения экспозиции облучения умень-



шаются в диаметре. Нами также было выявлено значительное снижение средней шероховатости клеточной поверхности (см. таблицу).

Основной мишенью для синглетного кислорода и активных радикалов при фотодинамическом воздействии в первую очередь является клеточная стенка микроорганизмов, строение которой определяет различия в чувствительности грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [3]. Изменения в структуре клеточной стенки при фотовоздействии с различными параметрами представлены в ряде исследований [3, 14–18]. Изучение диких и мутантных штаммов *Cryptococcus neoformans* показало, что дефекты в синтезе клеточной стенки у мутантных клеток определяют повышенную чувствительность к комплексному действию хлорина еб и излучению красного диапазона [19]. Проведенный нами анализ морфологических изменений клеток стафилококка показал, что после инкубации с наночастицами оксида железа III и облучении синим (405 нм) светом в течение 30 мин на поверхности обнаруживается внешний фрагментарный слой толщиной около 70 нм. Мы предполагаем, что в ходе фотодинамических процессов происходило частичное разрушение целостности клеточной стенки исследуемых микроорганизмов, что проявлялось не только в виде морфологических изменений, но и в снижении выживаемости.

Список литературы

1. Michel M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci : therapeutic realities and possibilities // Lancet. 1997. Vol. 349. P. 1901–1906.
2. Grinholc M., Szramka B., Kurlenda J., Graczyk A., Bielawski K.P. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent // J. Photochem. Photobiol. : A Chem. 2008. Vol. 90(1). P. 57–63.
3. Hamblin M. R., Hasan T. Photodynamic therapy : a new antimicrobial approach to infectious disease? // J. Photochem. Photobiol. 2004. № 3. P. 436–450.
4. Гейнищ А. В., Сорокатый А. Е., Ягудаев Д. М., Трухманов Р. С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // Лазерная медицина. 2007. Т. 11, вып. 3. С. 42–46.
5. Guffey J. S., Wilborn J. In vitro bactericidal effects of 405 and 470 nm blue light // Photomed. Laser Surg. 2006. Vol. 24. P. 684–688.
6. Chirita M., Grozescu I. Fe₂O₃ – nanoparticles, physical properties and their photochemical and photoelectrochemical applications // Chem. Bull. «POLITEHNICA». 2009. Vol. 54(68), № 1. P. 1–8.
7. Bennet S. W., Keller A. A. Comparative photoactivity of CeO₂, γ-Fe₂O₃, TiO₂ and ZnO in various aqueous systems // Applied Catalysis B: Environmental. 2011. Vol. 102. P. 600–607.
8. Basnet R., Larsen G.K., Jadeja R. P. α-Fe₂O₃ nanocolumns and nanorods fabricated by electron beam evaporation for visible light photocatalytic and antimicrobial applications // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2013. Vol. 2. P. 2085–2095.
9. Tran N., Mir A., Malik D., Sinha A., Nayar S., Webster T. J. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus* // Intern. J. Nanomed. 2010. Vol. 5. P. 277–283.
10. Sharon M., Bonamali P., Kamat D. V. Photocatalytic killing of pathogenic bacterial cells using nanosize Fe₂O₃ and carbon nanotubes // J. Biomed. Nanotech. 2005. Vol. 1. P. 365–368.
11. Gonzales-Weimuller M., Zeisberger M., Krishnan K. M. Size-dependent heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia // J. Magn. Mag. Mat. 2009. Vol. 13. P. 1947–1950.
12. Ерохин П. С., Кузнецов О. С., Коннов Н. П., Видяева Н. А., Уткин Д. В. Комплексный подход к изучению биопленок микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2012. Т. 12, вып. 1. С. 42–46.
13. Поляков В. В., Смирнов В. А., Рубаишкина М. В. Исследование параметров биологических объектов методом атомно-силовой микроскопии // Изв. ЮФУ. Технические науки. 2011. № 4. С. 193–198.
14. Hamblin M. R., Viveiros J., Yang C., Ahmadi A., Ganz R. A., Tolkoff M. J. *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. Vol. 49. P. 2822–2827.
15. Sahu K., Bansal H., Mukherjee C., Sharma M., Gupta P. K. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // J. Photochem. Photobiol. B : Biology. 2009. Vol. 96. P. 9–16.
16. Sampaio de Melo A.M., Zanin I. J., Facanha da Costa E. Characterization of Antimicrobial Photodynamic Therapy-Treated Streptococci mutants : An Atomic Force Microscopy Study // Photomed. and Laser Surgery. 2013. Vol. 31 (3). P. 105–109.
17. Jin H., Huang X., Chen Y., Zhao H., Ye H., Huang F., Xing X., Cai J. Photoinactivation effects of hematoporphyrin monomethyl ether on Gram-positive and Gram-negative bacteria detected by atomic force microscopy // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 88. P. 761–770.
18. Jo W., Kim M. J. Influence of the photothermal effect of a gold nanorod cluster on biofilm disinfection // Nanotechnology. 2013. Vol. 24. P. 195–201.
19. Fuchs B. B., Tegos G. P., Hamblin M. R., Mylonakis E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Photodynamic Inactivation Is Associated with Cell Wall Integrity // Antimicrob. Agents Chemother. 2007. Vol. 51(8). P. 2929–2936.