

ID: 2012-06-1003-A-1587

Оригинальная статья

Пронина Е.А., Шуб Г.М.

Влияние электромагнитного излучения на бактериальные клетки

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Ключевые слова: ЭМИ, бактериальная клетка

В работе были использованы музейные и клинические штаммы *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Для выполнения поставленных задач использовали различные микробиологические, генетические и биохимические методы исследования.

Эксперименты по изучению воздействия электромагнитного излучения на частотах молекулярных спектров излучения и поглощения оксида азота и атмосферного кислорода проводились на впервые разработанных в Центральном научно-исследовательском институте измерительной аппаратуры г. Саратова генераторах, в которых возбуждались электромагнитные колебания, имитирующие структуру молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода на частотах $129 \pm 0,75$ ГГц и оксида азота $150 \pm 0,75$ ГГц.

В работе использовались два типа генераторов: стационарный и малогабаритный.

Точное значение заданной частоты определяли в соответствии с международной базой данных молекулярных спектров высокого разрешения HITRAN, созданной с участием космического агентства и с учетом поправок на атмосферное давление и температуру окружающей среды.

Малогабаритный генератор: разрешен к производству, продаже и применению в медицинской практике на территории РФ приказом Росздравнадзора от 14 августа 2009 года №. 6507-Пр./09.

Малогабаритный генератор использовался для облучения животных, при экспериментальной раневой инфекции; во всех остальных экспериментах использовался стационарный генератор.

Влияние электромагнитного излучения (ЭМИ) на частотах МСПИ NO и МСПИ O₂ на динамику развития популяций бактерий

В микробиологии успех любого исследования во многом зависит от того, настолько изучены характер роста данного микроорганизма и его питательные потребности. Характеристики роста отражают физиологические особенности микроорганизмов. Любое изменение внешней среды для растущих клеток можно рассматривать как стрессорные факторы. Первоначальный ответ микробных клеток на любой стресс направлен на то, чтобы нивелировать вызванные им сдвиги внутриклеточного равновесия и обеспечить свое выживание. Почти во всех случаях этот первый ответ основан на уже действующих биохимических механизмах. Во вторую очередь могут происходить изменения в экспрессии генов – для синтеза новых компонентов или для стимуляции имеющихся систем.

Объектом исследования были эталонные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538-P(209P).

Установлено, что электромагнитное излучение на частотах МСПИ O₂ и МСПИ NO в течение 15 и 30 минут, проведенное через 1 час от начала культивирования, не влияет на развитие популяции.

Из представленных данных (рис. 1-4) видно, что 15 минутное воздействие ЭМИ на частотах МСПИ O₂ и МСПИ NO, оказанное на 6-м часу культивирования, также практически не влияло на развитие популяции. Оптическая плотность облученных культур как кишечной палочки, так и стафилококка незначительно возрастала, но разница с контрольной пробой статистически недостоверна ($p > 0,05$).

После 30-минутного воздействия ЭМИ на частоте МСПИ O₂ на 6-м часу культивирования оптическая плотность облученных культур как кишечной палочки, так и стафилококка возрастала и составила для *E. coli* к 8-му часу – $1,0 \pm 0,03$ ед., а к 12-му часу – $1,42 \pm 0,04$ ед. В контрольной пробе показатель оптической плотности составлял $0,80 \pm 0,01$ ед. и $1,12 \pm 0,01$ ед. соответственно, для *S. aureus* к 8-му часу – $1,20 \pm 0,04$ ед.; к 12-му часу – $1,75 \pm 0,04$ ед., в контрольной пробе – $0,90 \pm 0,01$ ед. и $1,27 \pm 0,04$ ед. Таким образом, развитие популяции облученных культур по сравнению с контрольной культурой происходило более интенсивно.

Показатели оптической плотности культур *E. coli* и *S. aureus*, облученных ЭМИ на частоте МСПИ NO на 6-м часу культивирования в течение 30 минут, были немного ниже, чем контрольные, но эта разница статистически недостоверна ($p > 0,05$).

Результаты экспериментов, в которых культуры *E. coli* и *S. aureus* облучали на 12-м часу развития популяции ЭМИ на частотах МСПИ NO и МСПИ O₂ в течение 15 и 30 минут, свидетельствуют, что облучение, проведенное в это время, не влияет на развитие популяции. Показатели оптической плотности облученных и необлученных культур одинаковые.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что воздействие ЭМИ на частоте МСПИ O₂ в фазе логарифмического размножения стимулирует развитие популяции. Известно, что в этой фазе культуры бактерий обладают наибольшей физиологической активностью и проявляют высокую чувствительность к действию различных экзогенных и эндогенных факторов, стимулирующих или подавляющих их рост (Рассудов С.М., 1954; Гаврилюк Б.К., 1955). Различия в скорости размножения культур, облученных в начальной и максимальной стационарных фазах, статистически недостоверны.

Тот факт, что скорость развития популяций, облученных в начальной или максимальной стационарной фазах, существенно не изменяется, позволяет предположить, что активация роста культур, облученных в логарифмической фазе развития (6-й час), обусловлена в основном образованием кислорода в цитоплазме активно делящихся клеток.

С нашей точки зрения, облучение ЭМИ на частоте МСПИ O₂ не только и не столько активизирует кислород, содержащийся в питательной среде, но, главное, повышает реакционную способность не только кислорода, диффундируемого в биомассу, но и внутриклеточного кислорода за счет образования его реактивных форм.

Литературные данные указывают на то, что в зависимости от уровня концентрации в биообъектах оксида азота проявляется «двойственность» эффектов воздействия (Марков Х.М., 1996; Северина И.С., 1998; Снайдер С.Х., Бредт Д.С., 1992). С одной стороны, он является мессенджером при реализации значительного ряда физиологических функций. С другой стороны, при более высоком уровне концентрации оксида азота проявляется его цитотоксическое действие (Ванин А.Ф., 2000; Северина И.С., 1998).

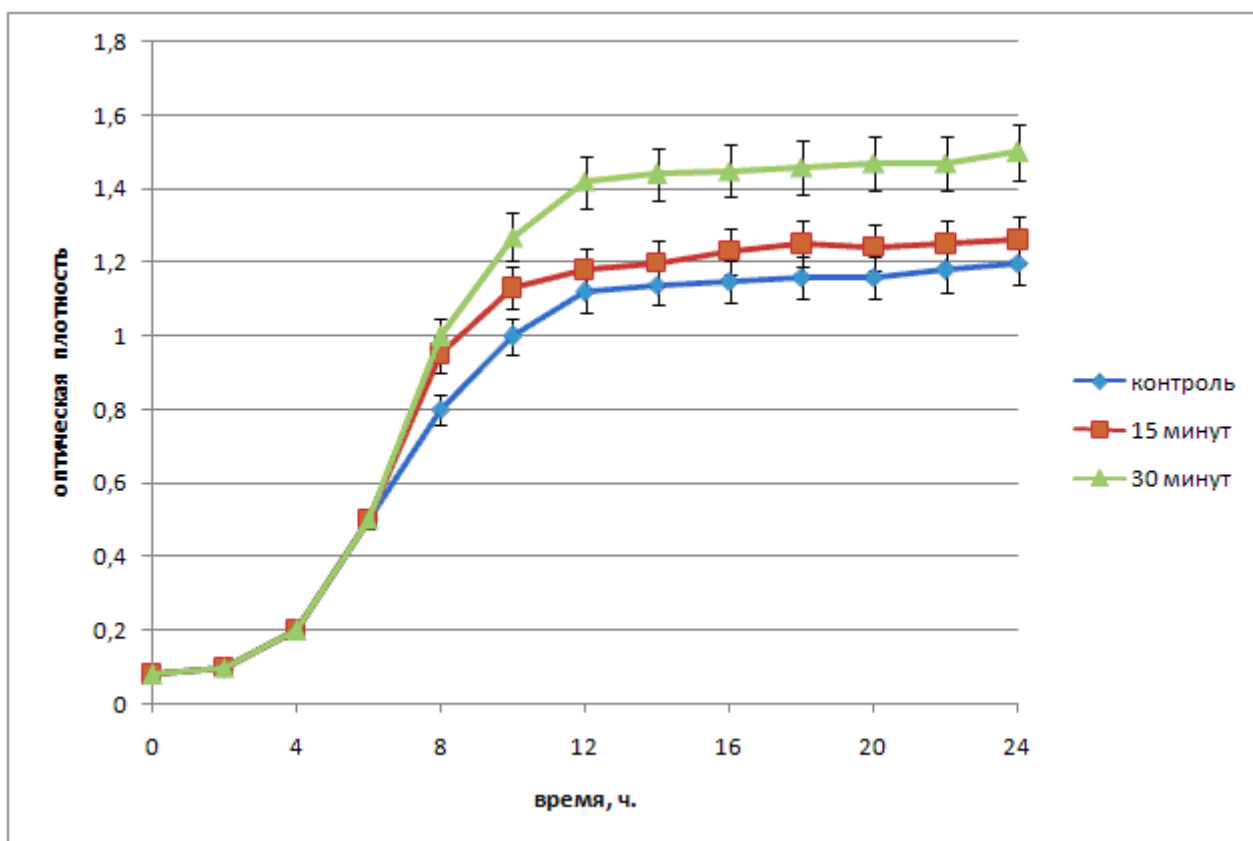


Рис. 1. Кривые роста культур *E. coli* при воздействии ЭМИ на частоте МСПИ O_2 через 6 часов от начала культивирования

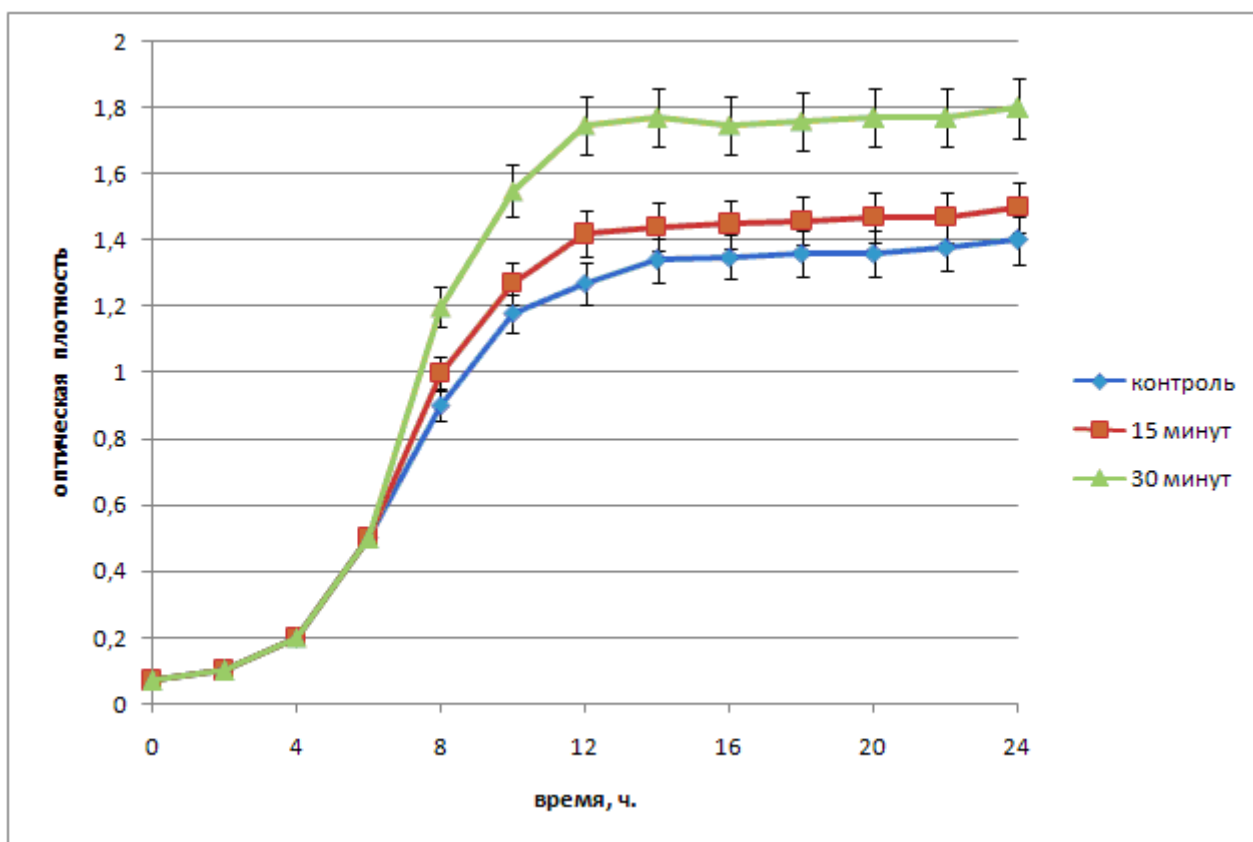


Рис. 2. Кривые роста культур *S. aureus* при воздействии ЭМИ на частоте МСПИ O_2 через 6 часов от начала культивирования

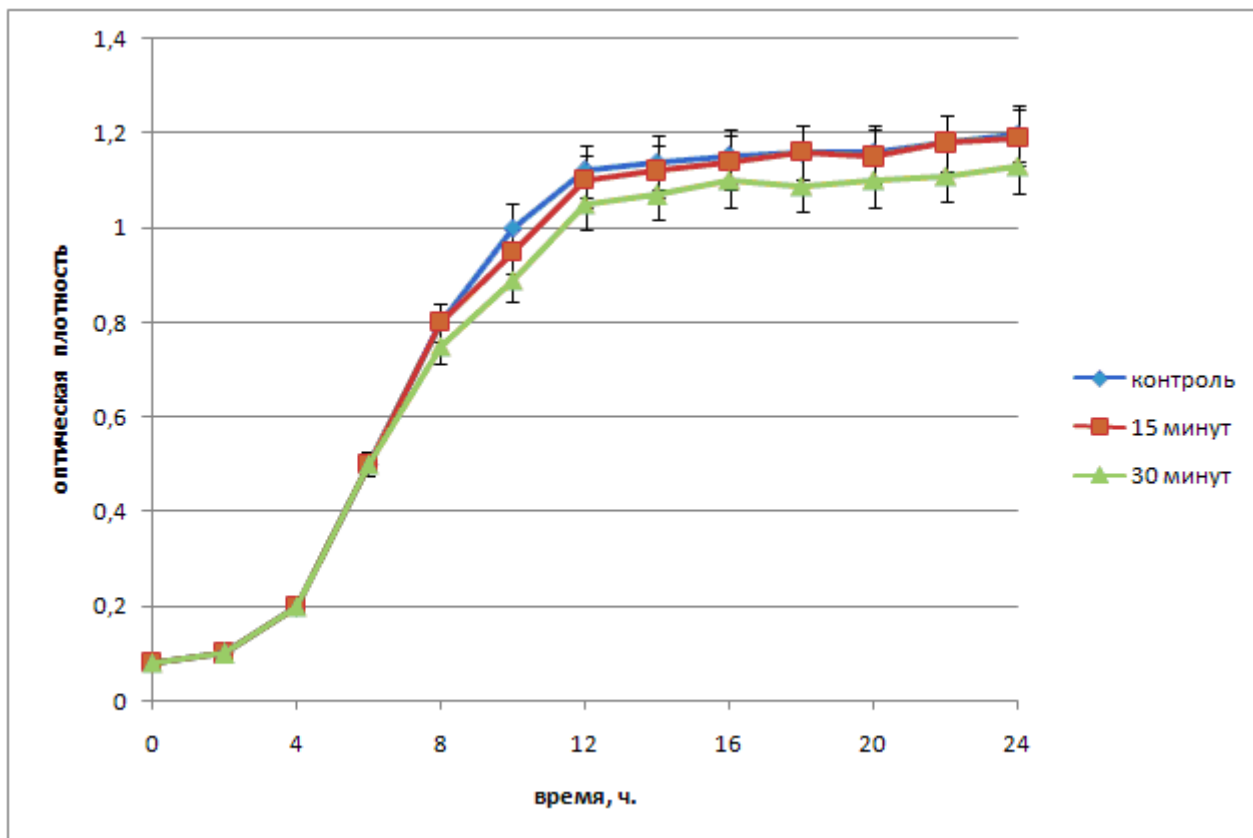


Рис. 3. Кривые роста культур *E. coli* при воздействии ЭМИ на частоте МСПИ NO через 6 часов от начала культивирования

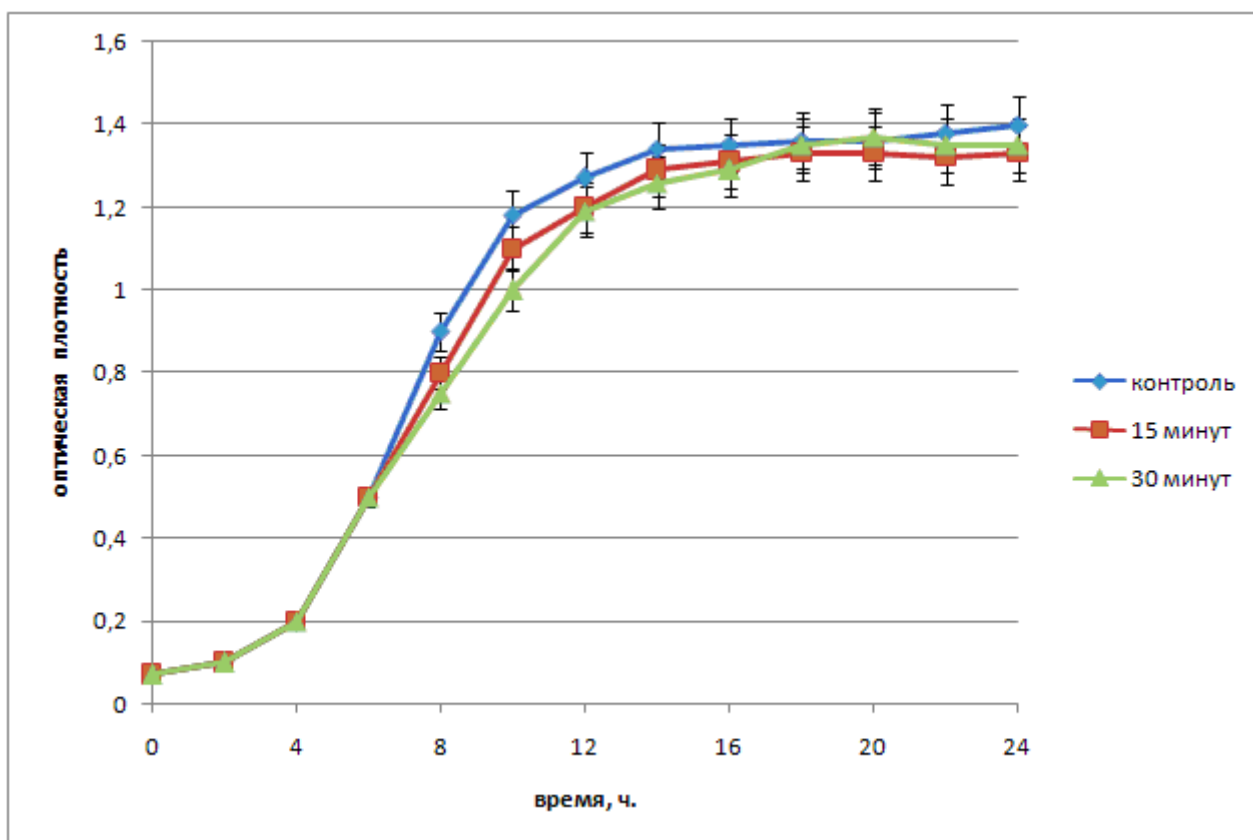


Рис. 4. Кривые роста культур *S. aureus* при воздействии ЭМИ на частоте МСПИ NO через 6 часов от начала культивирования

В наших опытах продемонстрировано, что облучение ЭМИ на частоте МСПИ NO не оказывает никакого влияния на развитие популяции, независимо от того, в какой фазе размножения производилось облучение электромагнитными волнами.

Влияние ЭМИ на частотах МСПИ NO и МСПИ O₂ на уровень устойчивости грамположительных и грамотрицательных бактерий к антибиотикам с различным механизмом действия

Помимо клинического, феномен лекарственной устойчивости представляет и общебиологический интерес, так как резистентность к потенциально повреждающим агентам свойственна клеткам самого разного происхождения. Выявление сущности и механизмов снижения чувствительности бактерий к антимикробным препаратам способствует пониманию общих закономерностей изменчивости и наследственности, взаимодействия хромосомных и внехромосомных генов, а также решению целого ряда других биологических проблем.

Изучение влияния на фенотипическое проявление устойчивости *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* к антибиотикам осуществлялось на 60 штаммах. В опыт взято по 20 культур каждого вида, обладающих различным уровнем устойчивости. Один антибиотик взят из группы ингибиторов синтеза пептидогликана, второй – ингибитор синтеза белка.

Нами показано, что облучение ЭМИ на частоте МСПИ O₂ при экспозиции 10 и 30 минут практически не изменяло чувствительности изученных штаммов *E. coli* как к цефотаксиму, так и гентамицину. Количество штаммов, для которых КИУ был равен двум или выше двух, составляло 20% как при 10-, так и при 30-минутной экспозиции.

Облучение ЭМИ на частоте МСПИ O₂ при экспозиции 10 и 30 минут ни в одном случае не изменяло уровень устойчивости изученных штаммов *P. aeruginosa* к амикацину и цефтазидиму.

Облучение ЭМИ на частоте МСПИ O₂ при экспозиции 10 и 30 минут изменяло чувствительность части изученных штаммов *S. aureus* как к линкомицину, так и к оксациллину. Количество штаммов, устойчивых к линкомицину, для которых КИУ был равен двум или выше двух, составляло 30% как при 10-, так и при 30-минутной экспозиции. Количество штаммов, устойчивых к оксациллину, для которых КИУ был равен или выше двух, составляло 20% при 10-минутной и 10% при 30-минутной экспозиции.

Облучение ЭМИ на частоте МСПИ NO изменяло чувствительность части изученных штаммов *E. coli* к цефотаксиму и к гентамицину. Количество штаммов, устойчивых к цефотаксиму, для которых КИУ был равен двум, составляло 20% как при 10-, так и при 30-минутной экспозиции. Количество штаммов, для которых КИУ был выше двух, составляло 20% при экспозиции 10 минут и 40% при экспозиции 30 минут. Количество штаммов, устойчивых к гентамицину, для которых КИУ был равен двум, составляло 20% при экспозиции 10 и 30 минут. Количество штаммов, устойчивых к гентамицину, для которых КИУ был выше двух, составляло 10% при экспозиции 10 минут и 20% при экспозиции 30 минут.

Облучение ЭМИ на частоте МСПИ NO изменяло чувствительность части изученных штаммов *P. aeruginosa* к амикацину и цефтазидиму. Количество штаммов, устойчивых к амикацину, для которых КИУ был равен двум, составляло 20% при 10- и 30% при 30-минутной экспозиции. Количество штаммов, для которых КИУ был выше двух, составляло 0% при экспозиции 10 минут и 10% при экспозиции 30 минут. Количество штаммов, устойчивых к цефтазидиму, для которых КИУ был равен двум, составляло 10% при экспозиции 10 и 30 минут. Количество штаммов, устойчивых к цефтазидиму, для которых КИУ был выше двух, составляло 10% при экспозиции 10 минут и 20% при экспозиции 30 минут.

Облучение ЭМИ на частоте МСПИ NO изменяло чувствительность значительной части изученных штаммов *S. aureus* как к линкомицину, так и к оксациллину. Количество штаммов, устойчивых к оксациллину, для которых КИУ был равен двум, составляло 40% при 10-минутной и 30% при 30-минутной экспозиции. Количество штаммов, для которых КИУ был выше двух, составляло 20% при экспозиции 10 минут и 40% при экспозиции 30 минут. В 30% случаев наблюдалось снижение МПК антибиотика до уровня, характерного для чувствительных штаммов. Количество линкомицинрезистентных штаммов, для которых КИУ был равен двум, составляло 20% при экспозиции 10 и 30 минут. Количество штаммов, устойчивых к линкомицину, для которых КИУ был выше двух, составляло 20% при экспозиции 10 минут и 40% при экспозиции 30 минут. Выраженность эффекта в отношении различных штаммов была неоднозначной и определялась не только разными частотными характеристиками облучения, но была обусловлена и индивидуальными особенностями штаммов.

Таким образом, облучение ЭМИ на частоте МСПИ NO при 30-минутной экспозиции приводило к снижению уровня устойчивости как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий ко всем изученным антибиотикам, независимо от уровня резистентности бактерий к антибиотикам.

Облучение ЭМИ на частоте МСПИ O₂ при экспозиции 10 и 30 минут существенно не влияло на уровень устойчивости *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* к антибиотикам с различным механизмом действия.

Влияние ЭМИ на частотах МСПИ NO и МСПИ O₂ на экспрессию генов лекарственной устойчивости

Прокариотическую клетку, как и любой живой организм, можно рассматривать как продукт ее генов. С этой точки зрения клеточный потенциал определяется совокупностью генов индивидуальной микробной клетки и тех генов, которые дополнительно присутствуют в «коллективном» видовом геноме.

По современным представлениям, хромосомы и плазмиды у прокариот равнозначны как носители генетической информации в том отношении, что экспрессируются под контролем одних и тех же регуляторных механизмов. Таким образом, пути регуляции, выявленные для одного типа этих генетических структур, должны относиться и к другим.

Изучение влияния ЭМИ на частотах МСПИ O₂ и МСПИ NO на экспрессию генов лекарственной устойчивости проведено на двух штаммах кишечной палочки: *E. coli* j 53 (RP-1), *E. coli* j 53 (R 100.1). Время экспозиции составляло 30 минут.

Как свидетельствуют представленные данные (рис. 5), спонтанное появление канамицинчувствительных вариантов наблюдалось у 9% клеток штамма *E. coli* j 53 (RP-1); стрептомицинчувствительных вариантов – у 4%, а левомицетинчувствительных вариантов – у 7% штамма *E. coli* j 53 (R 100-1).

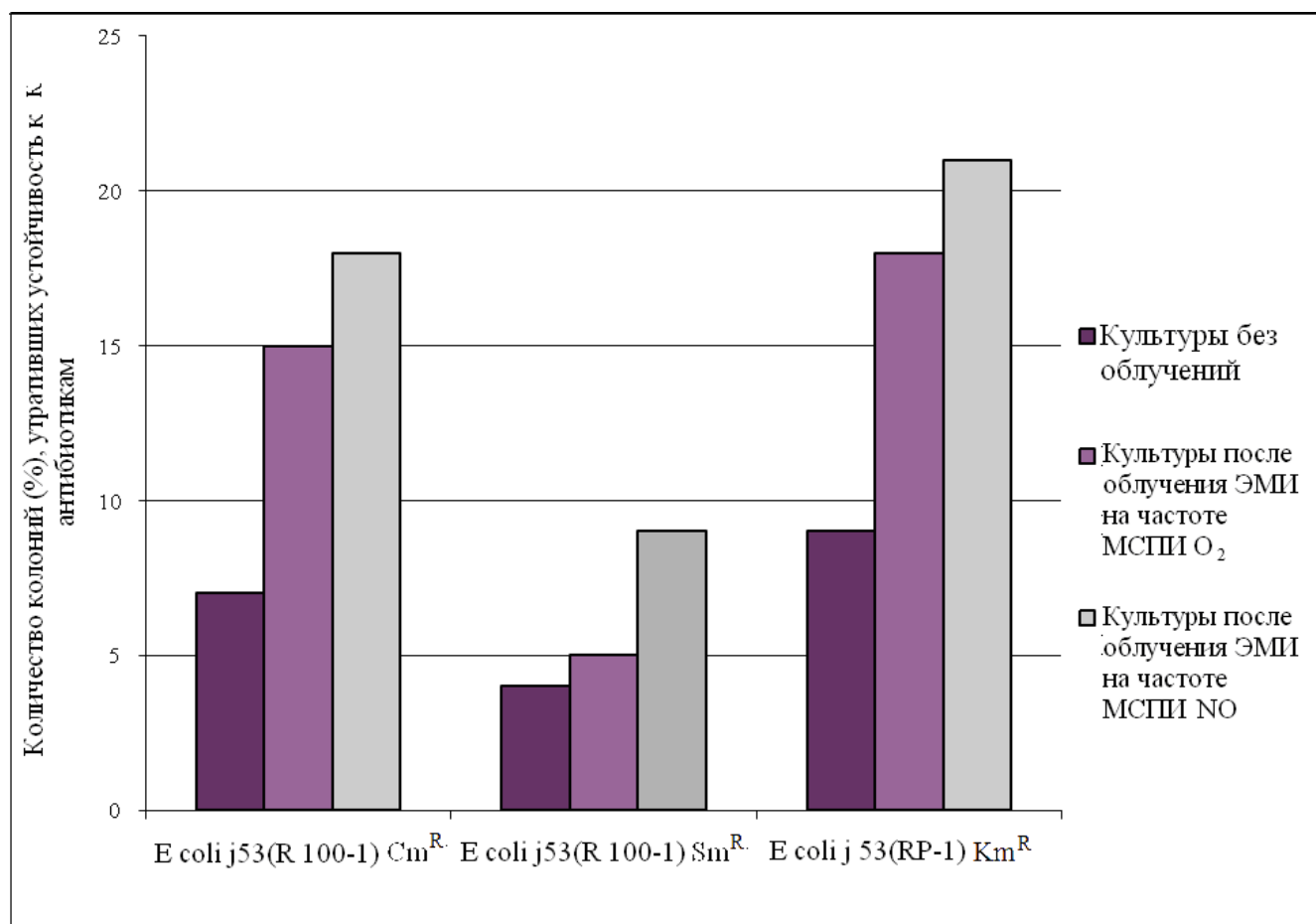


Рис. 5. Влияние ЭМИ на частотах МСПИ 0₂ и МСПИ 0₁ на экспрессию генов плазмид лекарственной устойчивости

После воздействия ЭМИ на частотах МСПИ 0₂ и МСПИ 0₁ количество чувствительных мутантов увеличивалось.

После воздействия электромагнитного излучения на частоте МСПИ 0₂ появление канамицинчувствительных вариантов обнаруживалось у 18% клеток штамма E. coli j 53 (RP-1), стрептомицинчувствительных вариантов – у 5%, а левомицетинчувствительных вариантов штамма E. coli j 53 (R 100-1) – у 15%.

Подобная тенденция наблюдалась и при воздействии ЭМИ на частоте МСПИ 0₁: отмечалось появление 21% канамицинчувствительных вариантов, 9% – стрептомицинчувствительных и 18% – левомицетин-чувствительных мутантов.

Полученные результаты дают основание предполагать, что облучение ЭМИ на частотах МСПИ 0₁ и МСПИ 0₂ при плотности мощности не более 0,3 мВт/см² угнетало экспрессию генов лекарственной устойчивости плазмиды E. coli RP-1, и плазмиды E. coli R100-1.