

О.А. Шулятникова, С.Е. Порозова, В.П. Коробов, А.М. Ханов, Г.И., Рогожников, Л.М. Лемкина, А.А. Гуров

Ингибирование образования микробной пленки при наноструктурировании поверхности конструкционного материала

ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь; ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь; ФГБУ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь

O. A. Shuliatnikova, S.E. Porozova, V.P. Korobov, A.M. Hanov, G. I., Rogoznikov, L. M. Lemkina, A. A. Gurov.

Inhibition of microbial film at the surface of the structural material nanostructuring

Резюме

Целью исследования было найти эффективный вариант ингибирования образования микробной пленки на конструкционном материале из диоксида титана. Контрольную и экспериментальную группы составили образцы из диоксида титана ($n=6$) и образцы диоксида титана с наноструктурированной поверхностью ($n=6$). Контрольную группу обрабатывали богатой питательной средой LB. В экспериментальную группу добавляли инокулум *S. epidermidis* 33 в среде LB. После 48 час. инкубации планктонную культуру удаляли и проводили окрашивание для определения биомассы (0,1%-ный раствор генцианвиолет) и количества живых клеток (водорастворимый тетразоллий) в биопленке. Все эксперименты проведены троекратно и прошли статистическую обработку. На контрольных образцах наноструктурированное покрытие диоксида титана не оказывает влияния на связывание красителя в среде LB, но практически в три раза достоверно снижает количество живых клеток *Staphylococcus epidermidis* 33 на экспериментальных образцах. Поверхностное наноструктурированное покрытие диоксида титана достоверно снижает в 2,5 раза процесс образования биопленок и приводит к более чем трехкратному достоверному снижению биомассы пленок *Staphylococcus epidermidis* 33 при культивировании в течении 48 часов. Данные факты имеют практическое значение для использования полученных данных эксперимента в клинической стоматологии в качестве способа ингибирования образования бактериальных пленок на поверхностях предложенных конструкционных материалов из диоксида титана с наномодифицированной поверхностной обработкой.

Ключевые слова: микробная пленка, ингибирование, диоксид титана, наномодификация поверхности.

Summary

The research objective was to find effective option of inhibition of formation of a microbic film on constructional material from dioxide of the titan. Control and experimental groups were made by samples of dioxide of the titan ($n=6$) and samples of dioxide of the titan with the nanostructured surface ($n=6$). The control group was processed a rich nutrient medium of LB. Added to experimental group *S. epidermidis* 33 in the environment of LB. After 48 hours of an incubation the planktonic culture was deleted and carried out coloring for biomass definition (0,1% solution gentsianviolet) and amounts of living cells (water-soluble tetrazoliya) in a biofilm. All experiments are made three times and have taken place statistical processing. On control samples the nanostructured covering of dioxide of the titan doesn't exert impact on binding of dye in the environment of LB, but almost three times authentically reduces amount of *Staphylococcus epidermidis* 33 living cells on experimental samples. The superficial nanostructured covering of dioxide of the titan authentically reduces process of formation of biofilms by 2,5 times and leads to more than triple reliable decrease in biomass of films of *Staphylococcus epidermidis* 33 at cultivation within 48 hours. These facts have practical value for use of the obtained data of experiment in clinical stomatology as a way of inhibition of formation of bacterial films on surfaces of the offered constructional materials from dioxide of the titan with the nanomodified surface treatment.

Keywords: film microbial inhibition, titanium dioxide, nano-surface modification

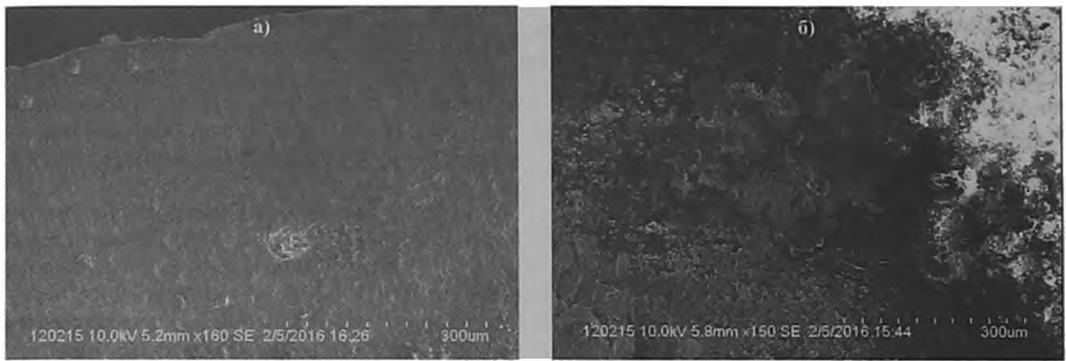


Рисунок 1. СЭМ-изображения поверхности образцов:
а – без наноструктурированного покрытия; б – с наноструктурированным покрытием.

Введение

Появление новых материалов для изготовления ортопедических конструкций, включая имплантационные системы, сопровождается ростом опасности возникновения нозокомиальных инфекций [1, 2], возбудителями которых чаще всего являются коагулазонегативные стафилококки. Их отличительной биологической особенностью является способность к образованию на поверхностях, фиксированных в сложноорганизованном внеклеточном матриксе, сообществ микроорганизмов биопленок [3, 4]. Биопленки существенно усложняют борьбу с инфекциями, так как их клеточные компоненты имеют повышенную устойчивость к действию антибиотических препаратов и факторов специфической и неспецифической противoinфекционной защиты организма человека [5, 6, 7].

Известны различные способы увеличения антибактериальной активности поверхности материалов. Так, в состав покрытий, наносимых на поверхность титановых имплантатов методом магнетронного распыления, вводят бактерицидные компоненты: ионы серебра или антибиотики [8]. Высокую антибактерицидную активность показал катионный пептид варнерин [9, 10].

Цель настоящего исследования: изучение влияния наноструктурирования поверхности конструкционных материалов на подавление пленкообразующих свойств микроорганизмов и/или разрушение уже образовавшихся биопленок на конструкционном материале. Выбор в качестве конструкционного материала спеченного диоксида титана в форме рутила обусловлен тем, что именно эта кристаллическая модификация образуется как при спекании изделий из диоксида титана, так и при окислении поверхности титана, в частности, титановых имплантатов. Ранее некоторыми авторами проводилось изучение возможности ингибирования микробной пленки на диоксиде циркония [10].

Материалы и методы

Образцы для проведения исследований были получены на кафедре «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета и представляли собой

диоксид титана в виде таблеток диаметром 5 мм и высотой 1,5 мм. При этом, часть таблеток подвергали предварительной обработке, нанося на поверхность методом золь-гель технологии наноструктурированный слой в виде низкотемпературной (и наиболее активной) формы диоксида титана анатаза [11]. На рис.1. представлены СЭМ-изображения поверхности образцов до и после нанесения наноструктурированного слоя, полученные на сканирующем электронном микроскопе Hitachi (Япония).

Покрытие толщиной 50-70 мкм образовано ламеллярными структурами, состоящими из отдельных дискообразных наноразмерных частиц. Расстояние между параллельными ламеллярными структурами соответствует величине двойного электрического слоя в золях (не более 100 нм).

Фазовый состав поверхности образцов определяли методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии) на Фурье-спектрометре Senterra (Bruker, Германия) при длине волны излучающего лазера 532 нм. На рис. 2 изображен рамановский спектр полученного покрытия, представленный низкотемпературной фазой анатаза и детектируемыми, но с очень низкой интенсивностью, пиками фазы рутила при 611 см⁻¹ и 446 см⁻¹. Наличие пиков рутила связано с тем, что образование покрытия происходит по островковому механизму.

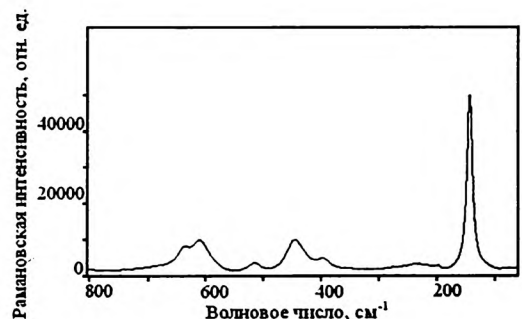


Рисунок 2. Рамановский спектр наноструктурированного покрытия на поверхности образца диоксида титана.

Исследование роста биопленок *S.epidermidis* 33 на экспериментальных образцах диоксида титана проведено в Лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь).

До начала экспериментов образцы диоксида титана с наноструктурированным поверхностным покрытием и без него помещали по одному в индивидуальные стеклянные флаконы и подвергали стерилизации автоклавированием при температуре 1210С и давлении 1 атм. в течение 60 мин.

В ходе эксперимента все таблетки образцов с наноструктурированной поверхностью и без поверхностной обработки были разделены на две группы:

1 группа n=6 (контрольная) для определения сорбции красителей поверхностью керамики. Из них образцы диоксида титана (n=3) и образцы диоксида титана с наноструктурированной поверхностью (n=3). В стерильные флаконы со стерильными таблетками вносили по 2 мл богатой питательной среды LB. Флаконы помещали в термостат при температуре 370С на 48 ч, затем дважды промывали 10 mM фосфатным буфером (pH=7,2) и окрашивали.

2 группа экспериментальная (n=6) - образцы из диоксида титана с наномодифицированным поверхностным слоем (n=3) и без него (n=3). Для изучения процессов пленкообразования *S.epidermidis* 33 во флаконы со стерильными таблетками добавляли по 2 мл инокулума *S.epidermidis* 33 в среде LB (107 КОЕ/мл), помещали их в термостат при температуре 370С на 48 ч без смены среды. После инкубации планктонную культуру удаляли, таблетки переносили в стерильные флаконы и дважды промывали 10mM фосфатным буфером, после чего помещали их в новые флаконы и окрашивали.

Таблетки всех выше перечисленных групп окрашивали двумя способами для определения биомассы и количества живых клеток в биопленке. Изучение биомассы пленок проводили путем измерения связывания клетками бактерий и матриксом биопленок красителя - 0,1%-ный раствор генцианвиолет. Несвязанный краситель удаляли путем двукратного промывания буфером с последующей экстракцией связавшегося красителя 96% этанолом в течение 12 ч и детекцией оптической плотности (OD) спиртового экстракта на спектрофотометре PD-303 (APEL, Япония) при длине волны 570 нм в кюветках на 1 см.

Количество жизнеспособных клеток в биопленках выявляли по уровню восстановления водорастворимого тетразолия MTS в системе Cell Proliferation Assay («Promega», США) по прописи фирмы-производителя. Количество образовавшегося формазана измеряли на спектрофотометре СФ РД-303 при длине волны 490 нм в кюветках на 1 см.

Все эксперименты проведены трехкратно. Для повышения корректности сравнения полученных экспериментальных данных их выражали в условных единицах (УЕ), отражавших отношение оптической плотности растворов восстановленного генцианвиолета или тетразолия на 1 см² поверхности экспериментальных образцов.

Статистическую обработку, полученных результатов эксперимента проводили с помощью программного обеспечения «Prism 6» (Graph Pad Software Inc., США) с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверность, полученных результатов, оценивали при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Полученные и обработанные результаты экспериментального исследования содержания живых клеток *Staphylococcus epidermidis* 33 в пленках, культивировавшихся в течение 48 ч, представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, на контрольных образцах наноструктурированное покрытие диоксида титана не оказывает влияния на связывание красителя (формазана) в среде LB, но практически в три раза достоверно снижает количество живых клеток *Staphylococcus epidermidis* 33 в биопленках после их 48 ч выращивания на экспериментальных образцах.

На рис. 3 представлены результаты определения биомассы пленок *Staphylococcus epidermidis* 33 через 48 ч роста на образцах из диоксида титана с различными подходами при технологической обработке их поверхности.

Приведенные данные показывают, что наноструктурирование поверхности диоксида титана приводит к достоверному значительному снижению, практически, в 2,5 раза, связывания красителя генцианвиолета. Таким образом, подтверждено существенное снижение роста биомассы пленок *Staphylococcus epidermidis* 33 при их культивации на наноструктурированной поверхности диоксида титана.

Таблица 1. Сорбция красителя (формазан) на таблетках из диоксида титана

Характеристика образцов	Сорбция красителя (формазан) образцами в среде LB (контроль)	Биопленки <i>Staphylococcusepidermidis</i> 33 (OD) (48 ч)
Диоксид титана	0,04±0,001	5,57±0,009
Диоксид титана с наноструктурированной поверхностью	0,042±0,001 p>0,05	1,79±0,043 p<0,05

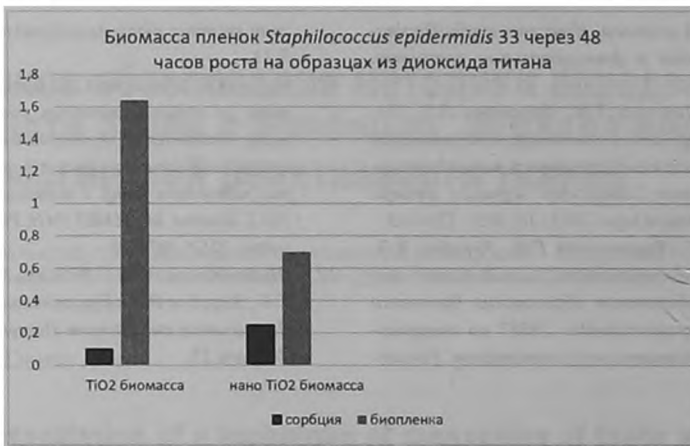


Рисунок 3. Сравнение содержания биомассы в 48-ми часовых био пленках Staphylococcus epidermidis 33 на образцах из диоксида титана.

Выводы

1. Нанесение наноструктурированного покрытия анатаза на поверхность диоксида титана достоверно снижает биомассу образовавшихся био пленок Staphylococcus epidermidis 33 при двухсуточном культивировании в 2,5 раза.

2. Одновременно происходит существенное, более чем в три раза, уменьшение количества жизнеспособных клеток Staphylococcus epidermidis 33.

Данные факты имеют практическое значение для использования полученных экспериментальных результатов в клинической стоматологии в качестве способа ингибирования образования бактериальных пленок на поверхностях предложенных конструкционных материалов из диоксида титана и титана (патент РФ № 153902). ■

О.А. Шулятникова – к.м.н., доцент кафедры ортопедической стоматологии Пермского государственного медицинского университета им. ак. Е.А. Вагнера; **С.Е. Порозова** – д.т.н., профессор кафедры «Материалы,

технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета; **В.П. Коробов** – к.м.н., заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; **А.М. Ханов** – д.т.н., профессор, Заслуженный работник высшей школы РФ, заведующий кафедрой конструирования машин и технологий обработки материалов Пермского национального исследовательского политехнического университета; **Г.И. Рогожников** – д.м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е.А. Вагнера; **Л.М. Лемкина** – к.м.н., старший научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; **А.А. Гуров** – аспирант кафедры «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета; Автор, ответственный за переписку - Шулятникова Оксана Александровна, г. Пермь, 614022, ул. Карпинского, д.38, кв.1, e-mail: anasko06@mail.ru

Литература:

1. Cho D.G., Kim C.H., Lee B.K., Cho S.H. Comparison of antibiotic resistance of blood culture strains and saprophytic isolates in the presence of biofilms, formed by intercellular adhesion (ica) gene cluster in Staphylococcus epidermidis. J. Microbiol. Biotechnol 2005; 15: 728-733.
2. Kiem S., Oh W.S., Peck K. R. et al. Phase variation of biofilm formation in Staphylococcus aureus by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. J. Kor. Med. Sci. 2004; 19: 779-782.
3. Davey M.E., O'Toole G.A., Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000; 64 (4): 847-867.
4. Vuong C., Gerke C., Somerville G.A. et al. Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in Staphylococcus epidermidis. J. Infect. Dis. 2003; 188: 706-718.
5. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15: 167-193.
6. Lewis K. Riddle of Biofilm. Resistance Antimicrobial agents and Chemotherapy 2001; 45(4): 999-1007.
7. Karen D. Xu, Gordon A. McFeters, Philip S. Stewart. Biofilm resistance to antimicrobial agents. J. Microbiology. 2000; 146:547-549.
8. Сухорукова И.В., Швейко А.Н., Штанский Д.В. Влияние состава и шероховатости поверхности покрытия TiCaPCON-Ag на кинетику выхода Ag в

- физиологический раствор. Известия вузов. Порошковая металлургия и функциональные покрытия. 2015; 3: 53-61.
9. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Филатова Л.Б., Полюдова Т.В. Разрушение биопленок коагулазонегативных стафилококков катионным пептидом варнерином. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011; 13; 5(3): 156-159.
 10. Рогожников А.Г., Рогожников Г.И., Коробов В.П. и соавт. Экспериментальное исследование возможности ингибирования образования биопленки *Staphylococcus epidermidis* 29887 на поверхности новых имплантационных материалов. Российский вестник дентальной имплантологии. 2014; 2: 7-13.
 11. Гуров А.А., Порозова С.Е. Получение диоксида титана из водно-этанольных растворов с полимерными добавками. Функциональные материалы и высокочистые вещества: сб. материалов III Всероссий. молодёжн. конф. с элементами научной школы 2012, Москва. М.: ИМЕТ РАН, РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2012: 187-188.
 12. Шулятникова О.А., Рогожников Г.И., Порозова С.Е., Коробов В.П., Рогожников А.Г., Лемкина Л.М. Дентальный имплантат. Патент РФ 153902. 2015. Февраль 25.