

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ НА *ESCHERICHIA COLI* СУПЕРГИДРОФИЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МАГНИЕВОГО СПЛАВА

© 2021 г. В. В. Каминский^{a, b}, А. М. Емельяненко^{c, *}, А. В. Алешкин^a,
К. А. Емельяненко^c, Л. Б. Бойнович^c

^aМосковский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, 125212 Россия

^bРоссийский научный центр рентгенорадиологии Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

^cИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: ame@phyc.ace.ru

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

После доработки 19.05.2021 г.

Принята к публикации 20.05.2021 г.

Установлено, что поверхность магниевого сплава МА8, модифицированная методом лазерной обработки, приобретает супергидрофильные свойства и высокую бактерицидную активность в отношении взаимодействующей с ней *Escherichia coli* K12 С600. Основными механизмами бактерицидного действия являются нарушение целостности наружной мембраны бактериальной клетки при ее перфорировании наночастицами на текстурированной поверхности и подщелачивание дисперсионной среды при ее взаимодействии с металлом. Предложенный метод открывает новые перспективы защиты металлов от биокоррозии путем создания супергидрофильных покрытий с высокими бактерицидными свойствами.

Ключевые слова: антибактериальные поверхности, лазерное модифицирование поверхности, экстремальное смачивание, контактный бактериолиз

DOI: 10.31857/S0026365621050098

В последние годы резко возрос интерес научного сообщества к изучению поведения магния и его сплавов в различных средах и к разработке новых материалов на основе магния для биомедицины. Такому интересу способствуют биосовместимость магния, возможность его использования в качестве имплантов и других биоразлагаемых устройств и, наконец, привлекательные механические свойства магниевых сплавов. Дополнительным, очень ценным свойством материалов на основе магния является их антибактериальный потенциал, поскольку инфекции относятся к одним из самых неблагоприятных осложнений, связанных с имплантацией любого устройства. Поэтому в настоящее время значительные усилия направляются на исследование бактерицидных свойств материала при одновременном анализе скорости его деградации. Ранее, на примере сплавов меди, нами было показано, что супергидрофильные поверхности, получаемые лазерным текстурированием, обладают значительным антибактериальным потенциалом (Емельяненко и соавт., 2019; Emelyanenko et al., 2020). Что касается

магния, для борьбы с бактериальными загрязнениями до настоящего времени в литературе описывалось его применение в виде суспензий оксида магния в воде или частиц магния и магниевых сплавов в качестве наполнителей для полимерных матриц (Li et al., 2018). Одной из основных проблем использования бактерицидных свойств металлов и их оксидов является плохо контролируемое распределение частиц в жидкой среде и их быстрая седиментация.

В этой работе мы опишем метод приготовления пластин магниевого сплава МА8, декорированного микро- и наночастицами оксида магния, применение которых позволяет с высокой эффективностью деконтаминировать капли бактериальной суспензии *Escherichia coli* K12 С600. Наблюдаемая нами кинетика деконтаминации магниевых поверхностей позволяет рассматривать магниевые сплавы с разработанными нами покрытиями как перспективный материал для производства поверхностей, к которым часто прикасаются инфицированные пациенты в учреждениях, связанных с оказанием медицинской помощи. К та-

ким поверхностям можно отнести ручки дверей, тумблеры выключателей, смывные кнопки и т.д. Простота получения покрытий и относительно низкая цена магниевых сплавов позволяет рассматривать разработанные покрытия, как эффективный и экономически обоснованный метод борьбы с распространением больничных инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследований противобактериальной активности магниевых сплавов был разработан метод лазерной обработки листов и пластин сплава МА8, приводящий к формированию на поверхности многомодальной шероховатости и значительному увеличению эффективной площади поверхности. Метод основан на растровом сканировании поверхности материала лазерным пучком наносекундной длительности и длиной волны 1.064 мкм. Для обработки образцов использовали лазерную установку “Аргент-М” (Россия) мощностью 20 Вт с иттербиевым волоконным лазером, имеющим диаметр пятна контакта с поверхностью 40 мкм, и блоком управления перемещением лазерного луча RAYLASE MS10 2 (Германия). В результате предварительных экспериментов был выбран режим лазерной обработки поверхности с частотой импульсов 20 кГц, длительностью импульсов 200 нс, плотностью растрового сканирования 50 линий/мм и скоростью движения лазерного пучка 200 мм/с.

Описанный режим лазерной обработки привел к формированию высокопористой супергидрофильной поверхности, в которую капиллярное впитывание капли исследуемой бактериальной суспензии происходило полностью в течение нескольких секунд. Для сравнения антибактериальной активности поверхностей исходного магниевого сплава (обозначенного в наших экспериментах как контроль) и супергидрофильного покрытия использовали пластины размером 10 × 10 × 1 мм.

В данной работе исследовали бактерицидную активность магниевых пластин по отношению к суспензии, содержащей клетки *E. coli* K12 С600 (В-7158; ГКПМ-Оболенск). Для приготовления бактериальной суспензии суточную бактериальную культуру *E. coli* вносили в мясопептонный бульон (МПБ; “Медгамал”) и инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Для экспериментов использовали суспензии бактериальных клеток с исходным титром 5×10^7 КОЕ/мл.

Необходимое в соответствии с экспериментальным протоколом количество контрольных и супергидрофильных пластинок помещали в стерильные боксы с предварительно созданными влажными условиями. Увлажнение обеспечивали размещением вдоль боковых стенок бокса филь-

тровой бумаги, смоченной физиологическим раствором. Поддержание насыщения водными парами препятствовало испарению воды из суспензии и поддерживало режим “влажного” контакта суспензия–подложка. Бактериальную загрязненность пластинки измеряли через определенное время (15 и 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч). Для количественной оценки бактерицидного действия после фиксированного времени контакта пластины с каплей суспензии, пластину помещали в пробирку с 1 мл стерильного физиологического раствора и встряхивали на шейкере при 250 об./мин в течение 10 мин. Из полученной бактериальной суспензии готовили 10-кратные разведения и по 0.1 мл из каждого разведения равномерно распределяли в чашках Петри по поверхности агара Мюллера–Хинтона (“HiMedia Laboratories Pvt. Limited”), и после 24 ч инкубации в термостате при 37°C определяли титр бактерий. Для каждого временного интервала использовали отдельные пластины, и каждый эксперимент повторяли не менее двух раз.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 8.0. Различия считали статистически значимыми при доверительной вероятности >0.95, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Морфологию бактериальных клеток, контактировавших с супергидрофильной поверхностью магниевого сплава, и текстуру самих супергидрофильных пластин исследовали во вторичных электронах с применением растрового электронного микроскопа, входящего в комплекс Helios Nanolab 600 (“FEI”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология супергидрофильного покрытия на магниевом сплаве, бактерицидные свойства которого исследовали в данной работе, представлена на рис. 1а.

Полученная после лазерной обработки поверхность характеризуется многомодальной шероховатостью, формируемой наночастицами и их микроагрегатами. Согласно закону Дерягина–Венцеля, такая шероховатость, в комбинации с гидрофильностью исходного магниевого сплава, обеспечивает супергидрофильное состояние поверхности.

При контакте капли бактериальной суспензии с такой поверхностью, как уже упоминалось выше, происходит капиллярная пропитка текстуры бактериальной суспензией. При этом, благодаря 100% влажности в боксе, жидкость сохранялась в порах в течение всего эксперимента, и бактериальные клетки в исследуемой системе находились

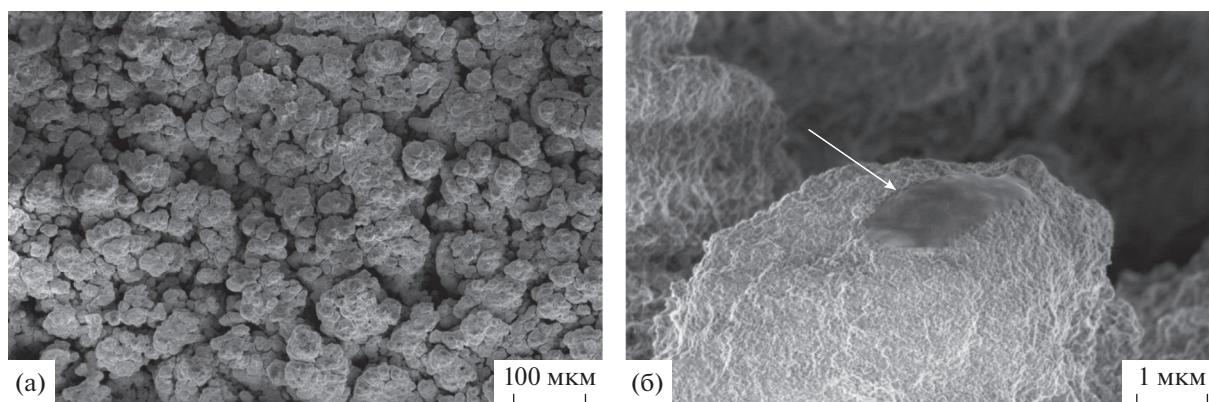


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение супергидрофильного покрытия на магниевом сплаве (а) и клетки *E. coli* (б, указана стрелкой), подвергшейся бактериолизу вследствие нарушения целостности наружной мембраны при ее перфорировании наночастицами при контакте с поверхностью покрытия.

как в планктонной форме, так и в виде клеток, осажденных на поверхность стенок текстуры. На контрольной пластине сплава магния суспензия сохраняла форму капли, практически не меняющейся за время наблюдения.

На гистограмме (рис. 2) представлено изменение во времени титра жизнеспособных клеток *E. coli* в суспензиях, контактировавших с супергидрофильной и контрольной пластинами; пунктирной линией показан титр исходной суспензии. Полученные данные показывают, что даже кратковременный контакт бактериальных клеток с поверхностью магниевых сплавов и процедуры изолирования клеток от подложки вызывают значительное снижение титра, по отношению к титру суспензии, исходно помещаемой на подложку. Однако при более длительном контакте бактерицидное действие супергидрофильной магниевой пластины проявляется значительно быстрее, чем контрольной. Так, уже через 4 ч титр бактерий был порядка 10^2 КОЕ/мл, что на 5 порядков ниже исходного и, по существу, может рассматриваться, как безопасная концентрация. После 24 ч контакта с бактериальной суспензией супергидрофильная пластина была полностью деконтаминирована. Жизнеспособность бактериальных клеток, контактировавших с контрольной пластиной, была значительно выше, и даже после 8 ч контакта бактериальный титр оставался на уровне 10^4 КОЕ/мл. После 24 ч концентрация жизнеспособных клеток оставалась на уровне 10^2 КОЕ/мл, что указывает на значимые бактерицидные свойства даже исходной пластины сплава МА8.

Остановимся теперь на механизмах бактерицидной активности магниевых сплавов, как для гладкой пластины, так и для супергидрофильной пластины, многомодальная поверхность которой обеспечивает значительное увеличение эффек-

тивной площади поверхности по отношению к геометрической или кажущейся площади.

Бактериальные клетки, попадающие на такую поверхность вследствие седиментации, погибают в результате действия комбинации различных факторов. С одной стороны, имеет место нарушение целостности наружной мембраны бактериальной клетки при ее перфорировании наночастицами, осаждающимися на поверхность в процессе лазерной обработки (Tripathy et al., 2017; Voinovich et al., 2018). Далее происходит деформация клетки, потеря внутриклеточной жидкости и бактериолиз (рис. 1б). С другой стороны, взаимодействие магния с коррозионно-активной средой, роль кото-

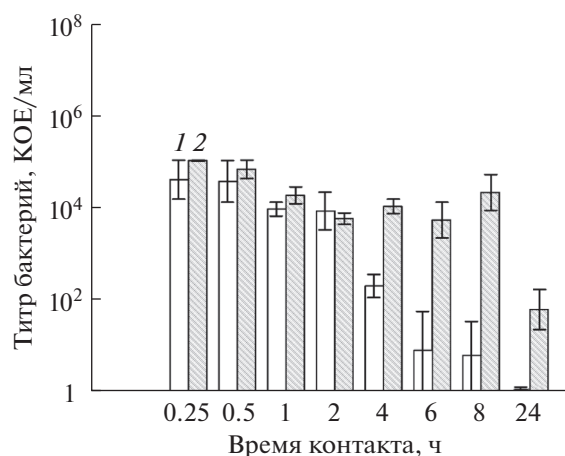


Рис. 2. Изменение титра бактериальных клеток *E. coli* при различных временах контакта капли бактериальной суспензии с супергидрофильной (1) и контрольной (2) магниевой пластинами. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение экспериментальных данных, пунктирной линией показан титр исходной суспензии.

рой в данном исследовании играет мясопептонный бульон, приводит к выделению водорода и резкому подщелачиванию жидкой среды. Ранее нами было показано (Емельяненко и соавт., 2019; Emelyanenko et al., 2020), что белки из МПБ адсорбируются на поверхность металла и стимулируют коррозию. Как отмечается в ряде исследований (Luque-Agudo et al., 2020; Lin et al., 2021), именно повышение рН среды и является одним из основных элементов токсического действия магния. Этот механизм приводит к гибели как планктонной формы бактерий, так и бактерий, находящихся на поверхности сплава. Здесь важно подчеркнуть, что если первый из указанных механизмов играет значительную роль только для поверхности с много-модальной шероховатостью, то механизм, связанный с ростом рН, важен и для гладких поверхностей, и для шероховатых. Однако скорость подщелачивания пропорциональна площади контакта подложки с коррозионной средой, а значит, будет выше именно для супергидрофильной поверхности, приводя к ускорению бактерицидного действия. Экспериментальные исследования эволюции рН в суспензиях, контактирующих с контрольной и супергидрофильной пластинами (Emelyanenko et al., 2021), подтверждают приведенный выше анализ.

Наконец, третьим важным механизмом гибели бактериальных клеток вблизи поверхностей из магниевых сплавов является повышение концентрации ионов магния в жидкой среде, приводящее к осмотическим эффектам в клетке (Luque-Agudo et al., 2020). Выполненные нами недавно исследования концентрации ионов магния в бактериальных суспензиях (Emelyanenko et al., 2021) показали, что, как правило, концентрация ионов магния в жидкой среде оказывается того же порядка, что и типичные внутриклеточные концентрации (Jahnen-Dechent and Ketteler, 2012; Luque-Agudo et al., 2020), что позволяет для обсуждаемой здесь системы не рассматривать механизм, связанный с осмотическими клеточными эффектами, как значительно влияющий на гибель бактерий в дисперсионной среде.

Таким образом, представленные здесь данные по действию пластин магниевых сплавов на планктонную и осажденную на подложку формы бактериальных клеток *E. coli* показывают, что эффективность бактерицидного действия магния оказывается близкой к таковой для меди (Емельяненко и соавт., 2019), рассматриваемой в литературе как один из самых сильных бактерицидных металлов. Однако широкому использованию антибактериальных свойств меди препятствует ее токсичность для человека. Для магниевых сплавов, при практически таком же значительном, как и для меди, антибактериальном эффекте, упоминания о токсичности в литературе отсутствуют. Полу-

ченные здесь данные показывают, что антибактериальные свойства используемого в работе супергидрофильного покрытия значительно превосходят отмеченные для гладкой контрольной пластины. Это открывает дальнейшие перспективы по подбору морфологии поверхности супергидрофильных покрытий, которая позволит в значительной степени усилить бактерицидный эффект магния.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ 18-29-05008 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Емельяненко А.М., Каминский В.В., Пыцкий И.С., Домантовский А.Г., Емельяненко К.А., Аleshkin A.B., Бойнович Л.Б. Антибактериальные свойства супергидрофильной текстурированной меди при контакте с бактериальными суспензиями // Бюлл. эксп. биол. мед. 2019. Т. 168. № 10. С. 474–478.
- Emelyanenko A.M., Kaminskii V.V., Pytskii I.S., Domantovsky A.G., Emelyanenko K.A., Aleshkin A.V., Boinovich L.B. Antibacterial properties of superhydrophilic textured copper in contact with bacterial suspensions // Bull. Exp. Biol. Med. 2020. V. 168. № 4. P. 488–491.
- Boinovich L.B., Modin E.B., Aleshkin A.V., Emelyanenko K.A., Zulkarneev E.R., Kiseleva I.A., Vasiliev A.L., Emelyanenko A.M. Antibacterial effect of textured surfaces induced by extreme wettability and bacteriophage seeding // ACS Appl. Nanomater. 2018. V. 1. P. 1348–1359.
- Emelyanenko A.M., Kaminsky V.V., Pytskii I.S., Emelyanenko K.A., Domantovsky A.G., Chulkova E.V., Aleshkin A.V., Boinovich L.B. Antimicrobial activity and degradation of superhydrophobic magnesium substrates in bacterial media // bioRxiv. 2021.04.29.441950. <https://doi.org/10.1101/2021.04.29.4419>
- Emelyanenko A.M., Pytskii I.S., Kaminskii V.V., Chulkova E.V., Domantovsky A.G., Emelyanenko K.A., Sobolev V.D., Aleshkin A.V., Boinovich L.B. Superhydrophobic copper in biological liquids: antibacterial activity and microbiologically induced or inhibited corrosion // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2020. V. 185C. Art. 110622.
- Jahnen-Dechent W., Ketteler M. Magnesium basics // Clin. Kidney J. 2012. V. 5 (Suppl. 1). P. i3–i14.
- Li L.Y., Cui L.Y., Zeng R.C., Li S.Q., Chen X.B., Zheng Y.F., Kannan M.B. Advances in functionalized polymer coatings on biodegradable magnesium alloys – A review // Acta Biomater. 2018. V. 79. P. 23–36.

Lin Z., Sun X., Yang H. The role of antibacterial metallic elements in simultaneously improving the corrosion resistance and antibacterial activity of magnesium alloys // Mater. Des. 2021. V. 198. Art. 109350.

Luque-Agudo V., Fernández-Calderón M.C., Pacha-Olivencia M.A., Pérez-Giraldo C., Gallardo-Moreno A.M.,

González-Martín M.L. The role of magnesium in biomaterials related infections // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2020. V. 191. Art. 110996.

Tripathy A., Sen P., Su B., Briscoe W.H. Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces // Adv. Colloid Interface Sci. 2017. V. 248. P. 85–104.

Efficiency and Mechanisms of Bactericidal Effect of Superhydrophilic Magnesium Alloy Surface against *Escherichia coli*

V. V. Kaminsky^{1,2}, A. M. Emelyanenko^{3,*}, A. V. Aleshkin¹, K. A. Emelyanenko³, and L. B. Boinovich³

¹Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 125212 Russia

²Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

³Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: ame@phyche.ac.ru

Received April 30, 2021; revised May 19, 2021; accepted May 20, 2021

Abstract—The surface of the MA8 magnesium alloy, modified by laser treatment, was found to acquire superhydrophilic properties and high bactericidal activity against *Escherichia coli* K12 C600. The main mechanisms of bactericidal action were disruption of the integrity of the bacterial outer membrane, which was perforated by nanoparticles on a textured surface, and alkalization of the dispersion medium when it interacted with the metal. The proposed method opens up new prospects for metal protection against biocorrosion by creating superhydrophilic coatings with high bactericidal properties.

Keywords: antibacterial surfaces, laser surface modification, extreme wettability, contact bacteriolysis