



Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта победителя конкурса

Название работы – Экспресс способ оценки антибиотикорезистентности бактерий с помощью зондовой сканирующей микроскопии.

Автор – Банков Александр Александрович (9 класс, ГАОУ ТО "ФМШ", г. Тюмень).

Руководитель – Тарасов Олег Александрович, учитель технологии, ГАОУ ТО "ФМШ".

Основная идея работы, цели, задачи

Последнее десятилетие такой замечательный инструмент исследователя, как зондовый сканирующий микроскоп (ЗСМ) стал более доступен. Благодаря высокому разрешению в диапазоне от микронных, до субмикронных и нано-размеров открываются широкие возможности для изучения тонкой структуры биологических объектов, не видимой в оптический микроскоп. Единственной альтернативой в нано- и субмикро-диапазоне является электронный сканирующий микроскоп ЭСМ, но он примерно в 60 раз дороже, чем ЗСМ. Единственным его преимуществами по сравнению с ЗСМ является быстрота работы. Если ЗСМ строит изображение размером 100x100 мкм в приемлемом качестве за один час, то ЭСМ делает это за минуту. Однако ЗСМ позволяет не только построить контуры изображения, но определить в каждой точке другие параметры объекта, например, намагниченность, жесткость, электропроводность. При этом воздействие зонда (иглы) на объект в полу-контактном режиме не приводит к его повреждению, что особенно важно для нежных биологических объектов. Кроме того, благодаря определению локальной жесткости, можно "почувствовать" внутреннее строение биологического объекта без его препарации.

Особенно интересно использовать ЗСМ для исследования бактерий, поскольку их размер (0,5-10 мкм) меньше типичного поля зрения этого микроскопа и можно изучить одновременно десятки и тысячи бактерий в одинаковых условиях [4]. При воздействии каких-либо факторов на бактерии, мы будем получать высоко достоверные (статистически обоснованные) результаты этого воздействия, связанные как с изменением размеров бактерий, так и физических свойств их мембран (жесткость, шероховатость) [1].

Эволюционно все живые организмы привыкли приспосабливаться к окружающей среде и внешним раздражителям, а современное человечество всё чаще сталкивается с тем, что бактерии и прочие микроорганизмы, вызывающие различные заболевания, поколение за поколением вырабатывают терпимость к различным видам антибиотиков. Остро стоит вопрос изучения эффективности новых антибиотиков, а также клинической применимости существующих антибиотиков в конкретных случаях [6].

Целью проекта является разработать и практически реализовать экспресс метод оценки антибиотикорезистентности бактерий.

В ходе проекта решались следующие *задачи*:

1. Проанализировать источники литературы, касающиеся использования зондового сканирующего микроскопа (ЗСМ) для исследования бактерий.
2. Ознакомиться с теоретическими основами зондовой микроскопии и приобрести навыки работы на Наноэдьюкаторе-II.
3. Провести экспериментальную апробацию предложенного метода оценки антибиотикорезистентности.

4. Подготовить методичку по лабораторной работе, демонстрирующий наш способ для учащихся Физико-математической школы Тюменской области и студентов Тюменского госуниверситета направлений «Нанотехнологии» и «Биология».
5. Найти партнеров для клинических испытаний и коммерциализации способа.

Новизна работы заключается в том, что практически испытан экспресс метод оценки резистентности бактерий на примере одного штамма бактерий и двух типов антибиотиков – нарушающих целостность клеточной стенки и блокирующих ее синтез, соответственно [8]. По крайней мере, для двух этих типов антибиотиков можно заключить, что вместо длительной процедуры бактериологического посева (4-7 дней) можно провести анализ на резистивность бактерий буквально за два часа. Первый час сканируются исходные бактерии, а второй час – бактерии, подверженные воздействию антибиотика в течение первого часа. Даже если в итоге данный способ будет пригоден для ограниченного круга видов бактерий и типов антибиотиков [3], все равно он позволит быстрее назначить правильный антибиотик тысячам людей по всему миру и быстрее начать лечение, пока не наступили осложнения. Это особенно важно в тяжелых случаях, когда счет идет буквально на часы.

Основные результаты

На всех образцах было получено параллельно расположению бактерий в поле зрения, рис. 1, соответствующее предварительно установленному параллельному расположению периодичности их рельефа, рис. 1. При этом, случаи перекрывания бактерий друг другом (когда одна бактерия лежала прямо на другой) носили единичный характер и могли быть практически полностью устранены уменьшением времени осаждения бактерий.

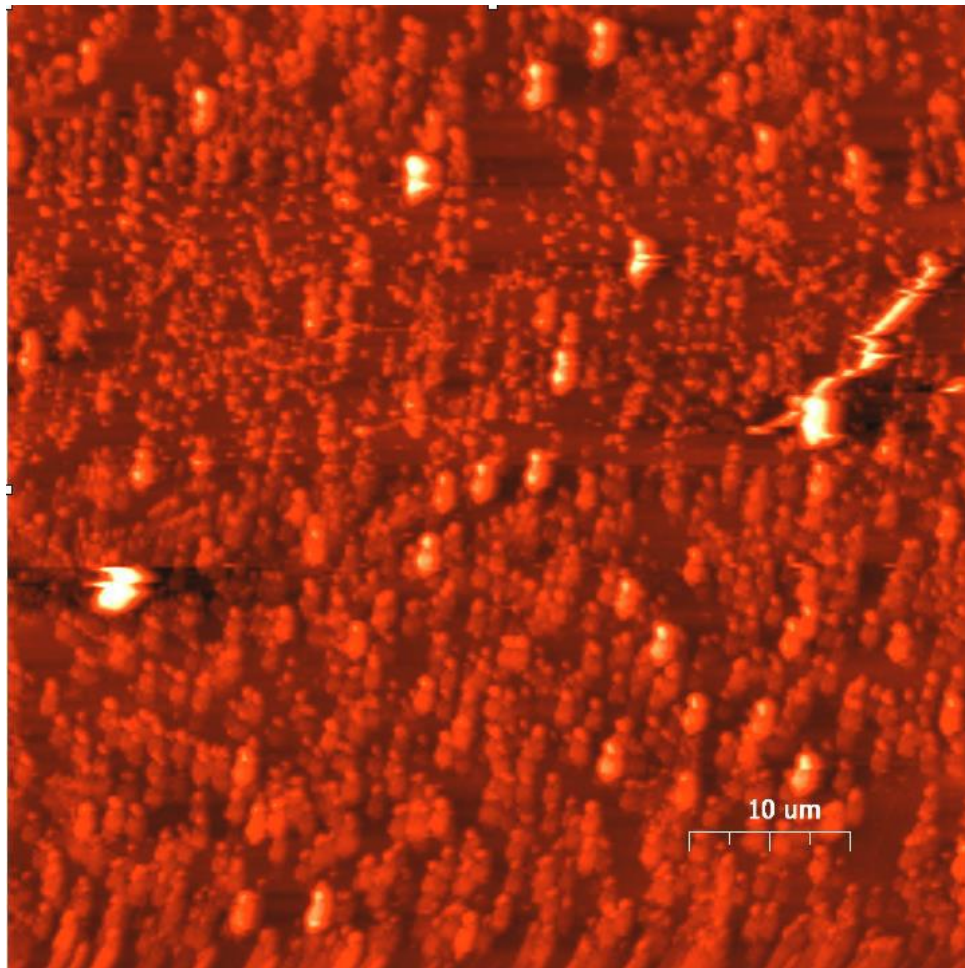


Рис. 1. Бактерии на покровном стекле в 2D. Масштаб 60×60 мкм.

На образцах подложек, подверженных влиянию антибиотика, геометрия мембран бактерий заметно поменялась. Так, после воздействия Грамицидина С мы видим нарушение целостности клеточной стенки всех бактерий в поле зрения (мембраны бактерий лопнули практически пополам и все бактерии, очевидно, погибли), рис 2. В случае же с антибиотиком Цифотаксимом, мы наблюдаем последствия нарушения синтеза клеточной стенки, рис 3. Также видно, что бактерий увеличились в размере на 20% -30%. Все бактерии увеличились в объеме при неизменной площади поверхности (их раздуло): на изображении хорошо видно их увеличение в ширину и высоту. Такое серьезное нарушение соотношения площади и объема бактерий также очевидно приводит к их гибели, т.к. процессы жизнедеятельности бактерии существенно нарушены.

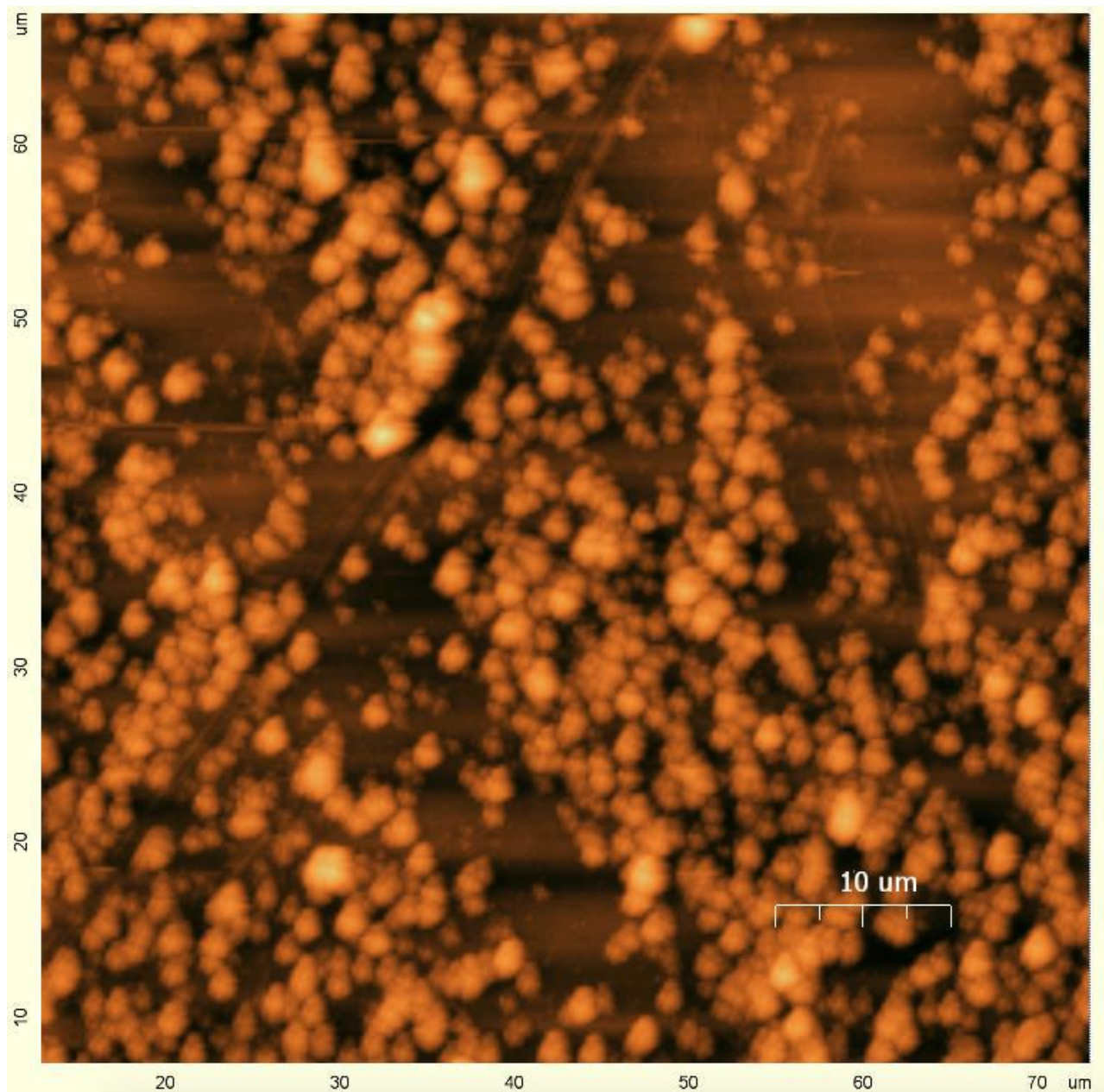


Рис. 2. После воздействия антибиотика (Грамицидин С) в 2D, нарушающего целостность клеточной стенки. Кадр 60х60 мкм.

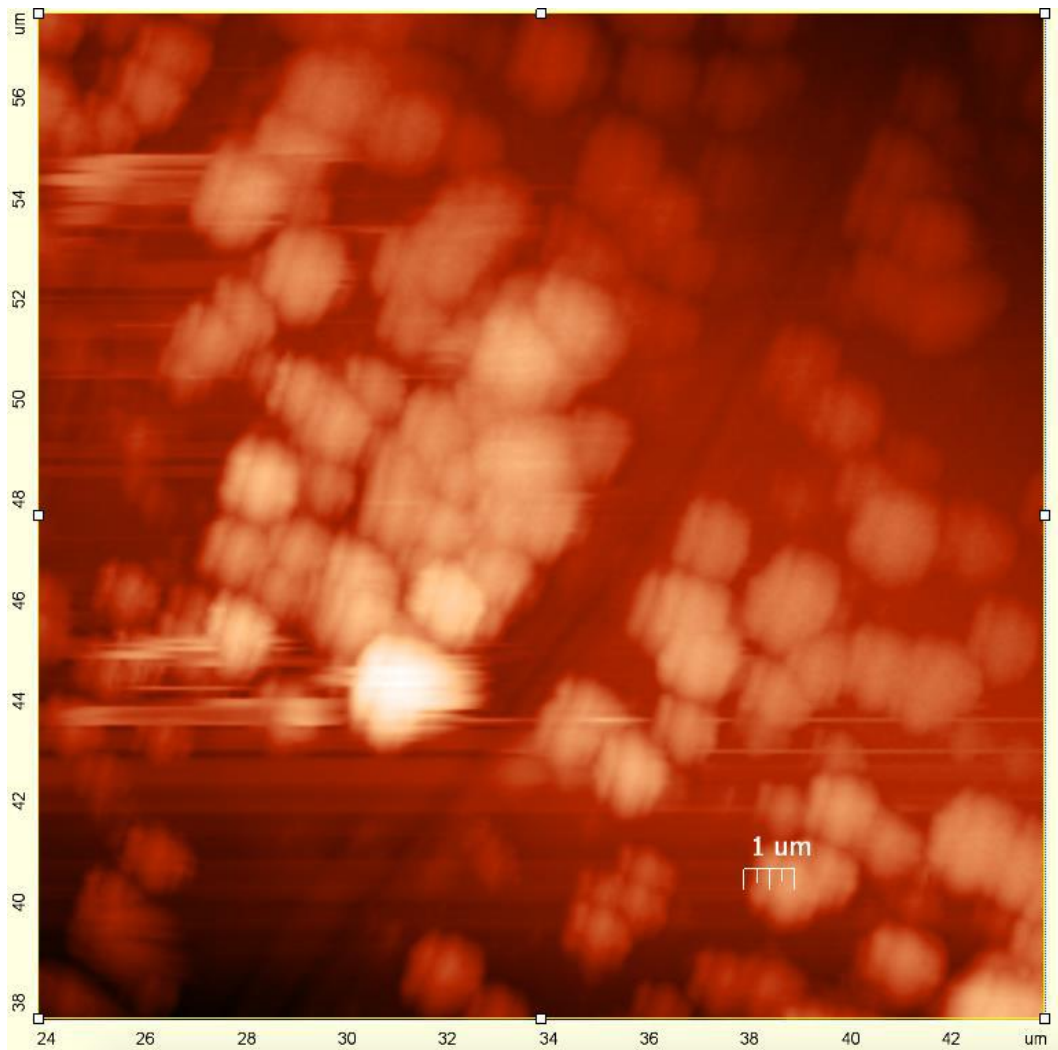


Рис. 2.1. После воздействия антибиотика (Грамицидин С) в 2D, нарушающего целостность клеточной стенки. Кадр 20х20 мкм.

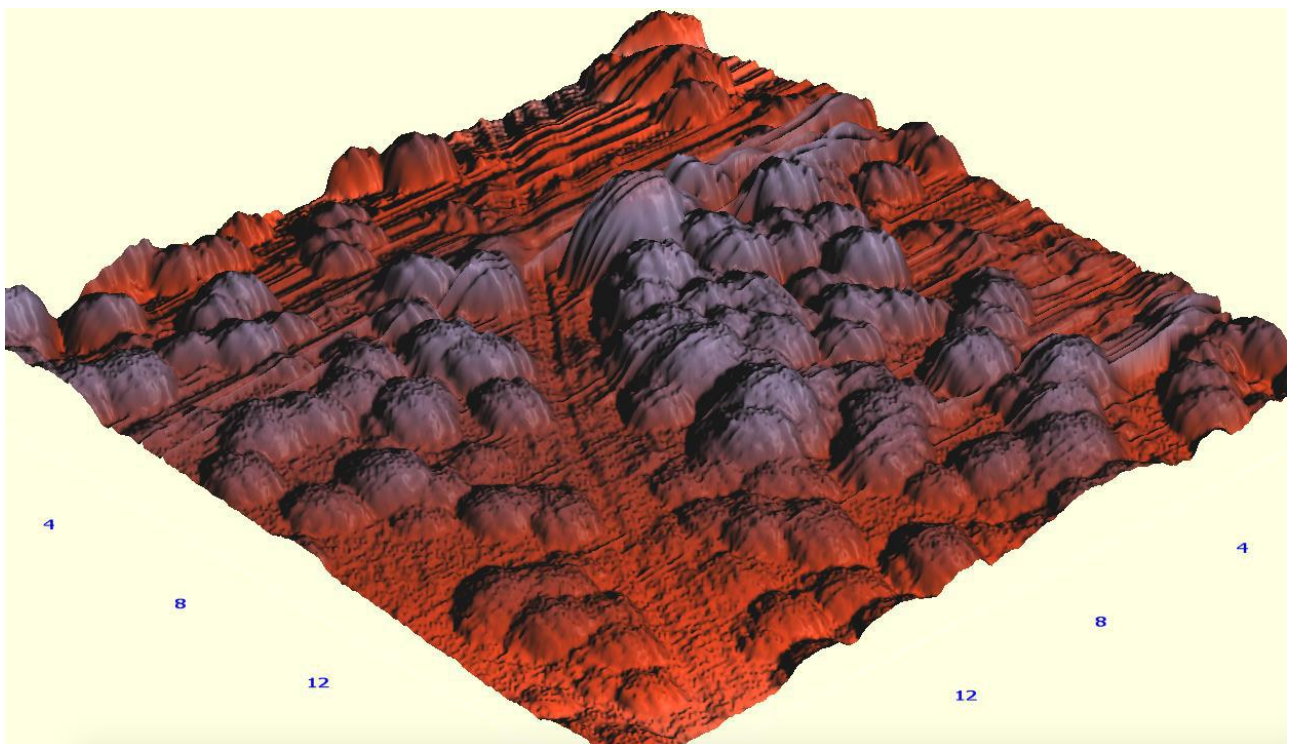


Рис. 2.2. После воздействия антибиотика (Грамицидин С) в 3D, нарушающего целостность клеточной стенки. Кадр 20х20 мкм.

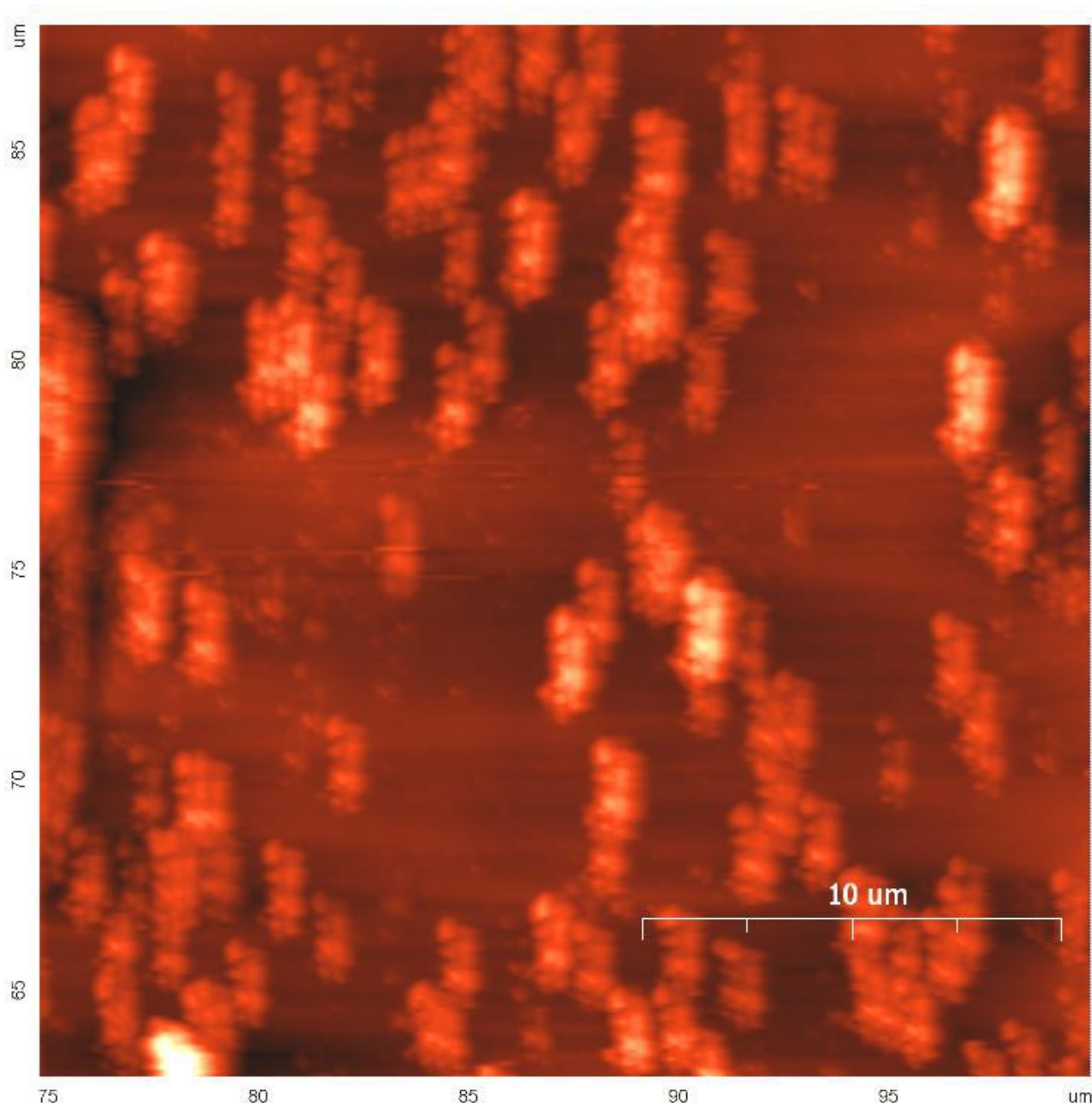


Рис. 3. После воздействия антибиотика (Цефотаксим), блокирующего синтез клеточной стенки. Кадр 25x25 мкм.

На образцах подложек с добавленными на них антибиотиками видно, что величина и динамика изменения геометрии мембран бактерий поменялась. Так, например, при воздействии Грамицидина С, мы видим нарушающего целостность клеточной стенки (мембрана бактерий лопнула), рис 2. А после взаимодействия с антибиотиком Цифотаксимом, мы видим нарушение синтеза клеточной стенки, рис 3. Бактерия увеличилась в объеме, и на изображении видно увеличение её в ширину и длину. Так как площадь и объем увеличились, то новой площади недостаточно для содержания «внутренних органов» бактерии и в результате она погибает.

И в сравнение с существующими способами мониторинга резистентности бактерий мы экспериментально доказали эффективность нашего метода. При использовании нашего метода работа занимает мало времени, перекрытие бактерий минимально и на изображении изначально видно какие изменения произошли со структурой бактерии.

Выводы, заключение, перспективы

- В ходе выполнения работы был разработан экспресс способ оценки антибиотикорезистентности бактерий.
- Показано, что для получения достоверного результата на чувствительность штамма бактерии к выбранному антибиотику достаточно двух часов, что принципиально быстрее существующего метода бактериологического посева (4-7 дней).
- Готовится заявка на изобретение «Экспресс способ оценки антибиотикорезистентности бактерий» и статья в реферативный журнал «Биотехнология» в раздел «Технология биопрепаратов».
- Готовится методичка по лабораторной работе, демонстрирующей наш способ, для учащихся Физико-математической школы Тюменской области и студентов Тюменского государственного университета направлений «Нанотехнологии» и «Биология».
- Проводится поиск партнеров для клинических испытаний и коммерциализации способа. Предварительные переговоры показали, что в клинических испытаниях смогут помочь Тюменская государственная медицинская академия и Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии. Начальная коммерциализация планируется по программе «Умник» со студентами медакадемии.

Список цитированных источников

1. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П. Микробиология, учебник. 2003.
2. Кухтевич И. В., Жуков М. В., Чубинский-Надеждин В. И., Букатин А. С., Евстапов А. А. Фиксация бактерий E.coli на подложке для измерений в жидкости методом атомно-силовой микроскопии // научное приборостроение, 2012, том 22, № 4, с. 56–61.
3. Effects and applications of sub-lethal ultrasound, electroporation and UV radiations in bioprocessing. Article in Annals of Microbiology · October 2012.
4. СЗМ NanoEducator. Руководство пользователя. http://nano.donstu.ru/labrab/szm_nanoeducator_rukovodstvo_polzovatelya_mac_os_.pdf.
5. Афанасьев К.Н., Волостников В.Г., Воронцов Е.Н., Коробцов А.В., Котова С.П., Лосевский Н.Н. Манипуляция биологическими микрообъектами оптическими пинцетами различных типов.
6. Абдулова Г.Б., Нурахова А.Д., Катаева Х.Т. Анализ результатов микробиологического мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов, выделенных в хирургическом стационаре.
7. Агеев О.А., Коноплев Б.Г., Поляков В.В., Светличный А.М., Смирнов В.А. Зондовая фотонно-стимулированная нанолитография структур на основе пленки титана.
8. Егупова Е.Ю., Багмет В.Б., Абдуллин Ш.Р. Воздействие антибиотиков и фунгицидов на цианобактерию *Nostos Punctiforme hariot* сопутствующие организации.