

УДК 579.22+57.013

ВЛИЯНИЕ НАНОКЛАСТЕРОВ СЕРЕБРА НА УСТОЙЧИВОСТЬ *ACHROMOBACTER INSOLITUS* LCU2 К МЕДИ¹

© 2025 г. Г. Л. Бурягина^{a, b, c, *}, А. С. Астанкова^{a, b}, Д. С. Чумаков^a, Е. В. Крючкова^{a, c}

^aИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,
Саратов, 410049, Россия

^bСаратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Саратов, 410012, Россия

^cСаратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова,
Саратов, 410012, Россия

*e-mail: burygingl@gmail.com

Поступила в редакцию 27.10.2024 г.

После доработки 26.11.2024 г.

Принята к публикации 26.11.2024 г.

В данной работе показано, что резистентность к меди (II) клеток штамма *Achromobacter insolitus* LCU2 была снижена добавлением в среду культивирования 1 мкМ нанокластеров серебра: максимальная толерантная концентрация снизилась в 4 раза, минимальная ингибирующая концентрация – в 25 раз. Предполагается, что нанокластеры нарушают функционирование системы эффлюкса меди (II) через связывание с CusC белком, что приводит к частичной утрате бактериями возможности экспортировать избыток катионов меди (II) из клеток.

Ключевые слова: нанокластеры, медь, резистентность, *Achromobacter insolitus* LCU2, эффлюксная помпа

DOI: 10.31857/S0026365625020081

Понимание механизмов устойчивости бактерий к различным токсикантам — актуальная проблема современной микробиологии и медицины. Для поддержания гомеостаза меди бактерии используют несколько стратегий: внеклеточная секвестрация биополимерами, связывание металлотioneиновыми белками в цитоплазме и активный выброс металла из клетки (Cervantes, Gutierrez-Corona, 1994; Magnani, Solioz, 2007). К генетическим детерминантам активного транспорта меди из клетки относятся генные кластеры *cop* и *cus*. АТФаза Р-типа CopA транспортирует Cu(I) из цитоплазмы в периплазму, в которой CueO оксидаза окисляет Cu(I) до Cu(II), а CusCFBA эффлюксная система экспортирует Cu(II) наружу (Hernández-Montes et al., 2012). Однако эффлюксные помпы, подобные CusCFBA, обуславливают также множественную лекарственную устойчивость бактерий, активно экспортируя из клеток антибиотики. Нанокластеры металлов могут влиять на работу бактериальных помп (Draviana et al., 2023). В частности, молекулярный докинг между эффлюксной помпой *Klebsiella quasipneumoniae* и покрытыми

глутатионом серебряными нанокластерами показал, что последние взаимодействуют с аминокислотными остатками внутри поры, уменьшая внутренний диаметр и препятствуя транспорту (Tumskiy et al., 2023).

Ранее нами был описан ризосферный штамм *Achromobacter insolitus* LCU2, способный к росту в присутствии высоких концентраций меди (II), в геноме которого были выявлены гены, кодирующие белки устойчивости к меди (Kryuchkova et al., 2024). Цель данной работы — изучить влияние нанокластеров серебра, покрытых глутатионом, на устойчивость штамма *A. insolitus* LCU2 к катионам меди (II).

Бактерии *A. insolitus* LCU2 (RCAM 04723, IBPPM 631) выращивали на малатно-солевой среде (Tkachenko et al., 2015) в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 18 ч в термошейкере (MB100-2a, “Allsheng”, Китай) при температуре 35°C и постоянном перемешивании 300 об./мин. Для определения устойчивости бактерий использовали 20 мМ раствор сульфата меди (II) в среде, из которого двукратным разведением готовили

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: DOI: 10.31857/S0026365625020081

варианты с конечными концентрациями катионов меди (II) от 2.4 мкМ до 5 мМ. Общий объем раствора в лунке составлял 300 мкл: 150 мкл — токсикант, 149 мкл — бактериальный инокулят, 1 мкл — 100 мкМ раствор нанокластеров. Каждую пробу готовили в трех повторностях. Токсичность нанокластеров серебра для культуры штамма L_{Cu2} оценивали в ряду двукратных разведений от 10 мкМ до 5 нМ. Оптическую плотность бактериальных культур измеряли при 600 нм с помощью планшетного ридера Multiskan Ascent (“Thermo”, Финляндия).

Нанокластеры серебра, покрытые защитным слоем глутатиона (GSH-AgNCs), получали, как описано в работе Tumskiy et al. (2023), с небольшими модификациями. Нанокластеры имели средний диаметр 2.2 ± 0.5 нм и значение дзета-потенциала -55.2 ± 2.54 мВ.

3D модели белков эффлюксной помпы CusCBA (QEK91978; QEK91979; QEK91980) штамма *A. insolitus* L_{Cu2} и их взаимодействие с медью предсказывали с использованием ресурса AlphaFold3 (Abramson et al., 2024).

Результаты влияния различных концентраций меди (II) на рост *A. insolitus* L_{Cu2} в течение 18 ч культивирования представлены на рисунке (а). Медь (II) в диапазоне концентраций от 2.4 до 40 мкМ не ингибировала рост культуры. Таким образом, значение максимальной толерантной концентрации (МТК) было определено как 40 мкМ. Концентрационно-зависимый эффект снижения роста бактерий наблюдался в диапазоне от 78 мкМ до 1.25 мМ. Значение EC₅₀ (ингибирование роста на 50% относительно контроля) было равно 0.3 мМ, а минимальной ингибирующей

концентрации (МИК), при которой не наблюдалось роста культуры, — 2.5 мМ. В процессе продолжительного культивирования *A. insolitus* L_{Cu2} был выявлен рост при более высоких концентрациях меди (II), но после лаг-фазы в 24 ч (Kryuchkova et al., 2024). И при кратковременном (18 ч), и при длительном (96 ч) культивировании штамм *A. insolitus* L_{Cu2} может быть охарактеризован как устойчивый к меди (II) в связи со способностью к росту при 1 мМ меди (II).

Внесение в среду с медью (II) 1 мкМ нанокластеров серебра (GSH-AgNCs) существенно снизило устойчивость *A. insolitus* L_{Cu2} к токсическому действию металла (рисунок, а). МТК для (GSH-AgNCs и меди (II)) составила 10 мкМ, что в 4 раз ниже МТК для среды только с медью (II). Полное ингибирование роста (МИК) было выявлено при концентрации меди (II) 0.1 мМ, что в 25 раз меньше значения МИК для среды без нанокластеров. Значение EC₅₀ для (GSH-AgNCs и меди (II)) составило 40 мкМ, что также в 7.5 раз ниже значения EC₅₀ для среды без GSH-AgNCs. При этом внесение отдельно нанокластеров серебра в исследуемых концентрациях не вызывало ингибирования роста *A. insolitus* L_{Cu2} (рис. S1, дополнительные материалы).

Предыдущий геномный анализ выявил наличие в геноме *A. insolitus* L_{Cu2} эффлюксной системы удаления меди RND-типа CusABC (Kryuchkova et al., 2024). Здесь мы приводим 3D модели эффлюксной помпы, образуемой Cus белками штамма L_{Cu2} (рисунок, б), взяв за основу структуру CusA₃—CusB₆—CusC₃, описанную ранее (Hernández-Montes et al., 2012). Эти модели дают представление о формировании трансмембранного канала (рисунок, в), через

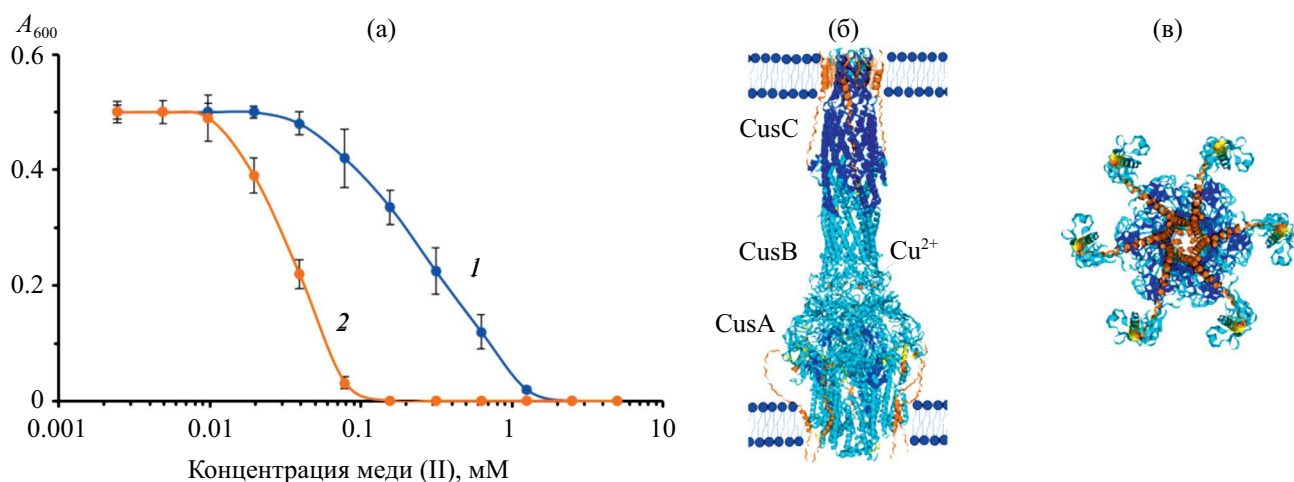


Рисунок. а — Влияние на жизнеспособность культуры штамма *A. insolitus* L_{Cu2} различных концентраций катионов меди (II) в среде (1) и совместного действия 1 мкМ GSH-AgNCs с катионами меди (II) (2); **б** — 3D модель эффлюксной помпы — белковый комплекс, образованный тримером CusA, гексамером CusB и тримером CusC штамма *A. insolitus* L_{Cu2}; **в** — горизонтальная проекция 3D модели комплекса белков CusBC, формирующего транспортную пору в наружной мембране клетки (катионы меди (II) показаны как шарики).

который может выводиться избыток меди и другие токсиканты, а также о взаимодействии меди (II) с CusA и CusB белками, необходимыми бактериям для устойчивости к меди (Franke et al., 2003).

Принимая во внимание инактивацию белка TolC нанокластерами серебра путем образования стабильных комплексов во внутреннем канале тримера (Tumskiy et al., 2023), мы предполагаем, что некоторые аминокислотные остатки CusC (QEK91978) штамма LCu2 также могут взаимодействовать с GSH-AgNCs, что приводит к снижению резистентности *A. insolitus* LCu2 из-за потери способности экспортировать медь (II) из клетки. Дальнейшее исследование будет посвящено моделированию взаимодействия между белками CusABC штамма LCu2 и использованными GSH-AgNCs.

Таким образом, в данной работе впервые показано усиление антимикробного действия катионов меди (II), опосредованное присутствием нанокластеров серебра. Предположительно, одной из причин может быть нарушение транспорта меди (II) из клетки вследствие взаимодействия нанокластеров с эффлюксной помпой. В связи с тем, что устойчивость к тяжелым металлам и антибиотикам у бактерий имеет общие механизмы, полученные нами результаты могут открыть новые перспективы в исследованиях, в целом бактериальной устойчивости к токсикантам, а также в поиске эффективных способов преодоления множественной лекарственной устойчивости бактерий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. Р.С. Тумскому и М.В. Филипповой за помощь в работе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 24-24-00520).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., Willmore L., Ballard A.J., Bambrick J., Bodenstein S.W., Evans D.A., Chia-Chun Hung, O'Neill M., Reiman D., Tunyasuvunakool K., Wu Z., Žemgulytė A., Arvaniti E., Beattie C., Bertolli O., Bridgland A., Cherepanov A., Congreve M., Cowen-Rivers A.I., Cowie A., Figurnov M., Fuchs F.B., Gladman H., Jain R., Khan Y.A., Low C.M.R., Perlin K., Potapenko A., Savy P., Singh S., Stecula A., Thillaisundaram A., Tong C., Yakneen S., Zhong E.D., Zielinski M., Židek A., Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J.M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // *Nature*. 2024. V. 630. P. 493–500.
- Cervantes C., Gutierrez-Corona F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi // *FEMS Microbiol. Rev.* 1994. V. 14. P. 121–137.
- Draviana H.T., Fitriannisa I., Khafid M., Krisnawati D.I., Widodo, Lai C.H., Fan Y.J., Kuo T.R. Size and charge effects of metal nanoclusters on antibacterial mechanisms // *J. Nanobiotechnol.* 2023. V. 21. Art. 428. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02208-3>
- Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D.H. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 3804–3812.
- Hernández-Montes G., Argüello J.M., Valderrama B. Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria // *BMC Microbiol.* 2012. V. 12. Art. 249. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-249>
- Kryuchkova Y.V., Neshko A.A., Gogoleva N.E., Balkin A.S., Safronova V.I., Kargapolova K.Y., Shagimardanova E.I., Gogolev Y.V., Burygin G.L. Genomics and taxonomy of the glyphosate-degrading, copper-tolerant rhizospheric bacterium *Achromobacter insolitus* LCu2 // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2024. V. 117. Art. 105. <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01989-3>
- Magnani D., Solioz M. How bacteria handle copper // *Molecular microbiology of heavy metals. Microbiology monographs*. V. 6. / Eds. Nies D.H., Silver S. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. P. 259–285. https://doi.org/10.1007/7171_2006_081
- Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Y., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Improved potato microclonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum* // *Agron. Sustain. Dev.* 2015. V. 35. P. 1167–1174.
- Tumskiy R., Khlebtsov B., Tumskaya A., Evstigneeva S., Antoshkina E., Zakharevich A., Khlebtsov N.G. Enhanced antibacterial activity of novel fluorescent glutathione-capped Ag nanoclusters // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. Art. 8306. <https://doi.org/10.3390/ijms24098306>

Effect of Silver Nanoclusters on the Copper Resistance of *Achromobacter insolitus* LCu2

G. L. Burygin^{1, 2, 3, *}, A. S. Astankova^{1, 2}, D. S. Chumakov¹, Y. V. Kryuchkova^{1, 3}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms,
Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov 410049, Russia*

²*Saratov State University, Saratov 410012, Russia*

³*Saratov State University of Genetics, Biotechnology, and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov 410012, Russia*
**e-mail: burygingl@gmail.com*

Abstract. In this work, the resistance of *Achromobacter insolitus* LCu2 cells to copper (II) was reduced by adding 1 μ M silver nanoclusters to the culture medium: the maximum tolerable concentration decreased by 4 times, the minimum inhibitory concentration – by 25 times. It is assumed that nanoclusters disrupt the functioning of the copper (II) efflux system through binding to the CusC protein, which leads to a partial loss of the ability of bacteria to export excess copper (II) cations from cells.

Keywords: nanoclusters, copper, resistance, *Achromobacter insolitus* LCu2, efflux pump