

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

О.В.Бухарин, Н.Б.Перунова, Е.В.Иванова, С.В.Андрющенко

МЕЖМИКРОБНОЕ РАСПОЗНАВАНИЕ «СВОЙ-ЧУЖОЙ» В ПАРЕ «ДОМИНАНТ-АССОЦИАНТ» ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* M-17 И *ESCHERICHIA COLI* ЛЭГМ-18

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Цель. Разработанный ранее метод межмикробного распознавания «свой-чужой» в паре «доминант-ассоциант» использовать для оценки чужеродности пробиотических культур *Escherichia coli* M-17 (с островом патогенности) и *E. coli* ЛЭГМ-18 (без острова патогенности). **Материалы и методы.** В качестве доминантов в работе использованы эталонные и клинические штаммы бифидобактерий, в качестве ассоциантов взяты культуры *E. coli* M-17 и ЛЭГМ-18, различающиеся по наличию генов, кодирующих колибактин. Определение феномена микробного распознавания проводили по разработанному алгоритму (Бухарин О.В., Перунова Н.Б., 2011), основанному на принципе индукции метаболитов в результате предварительного соинкубирования доминантов (бифидобактерий) с супернатантом ассоциантов и формирования обратной связи в паре «доминант-ассоциант». В качестве биологических характеристик исследуемых кишечных палочек были определены ростовые свойства, биоупленкообразование и антилизоцимная активность. **Результаты.** Тестирование культуры *E. coli* M-17 выявило угнетение изучаемых биологических признаков, и она оценивалась как «чужая», вероятно, за счет наличия острова патогенности, тогда как *E. coli* ЛЭГМ-18 (без этого фрагмента) резко усиливала свои биологические характеристики и подлежала оценке как «своя». **Заключение.** Использование межмикробного распознавания «свой-чужой» в паре «доминант-ассоциант» перспективно в качестве базового метода при отборе пробиотических штаммов и культур микроорганизмов для создания новых синбиотических композиций и пригодно для контроля за качеством пробиотической продукции.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 3—9

Ключевые слова: межмикробное распознавание «свой-чужой», метаболиты микроорганизмов, индукция, доминанты, ассоцианты, бифидобактерии, *Escherichia coli* M-17, *Escherichia coli* ЛЭГМ-18, колибактин, пробиотики

O.V.Bukharin, N.B.Perunova, E.V.Ivanova, S.V.Andryuschenko

INTERMICROBIAL «SELF-NON-SELF» DISCRIMINATION IN «DOMINANT-ASSOCIANT» PAIR OF PROBIOTIC STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* M-17 AND *E.COLI* LEGM-18

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Aim. To use earlier developed method of intermicrobial «self-non-self» discrimination in «dominant-associant» pair for the assessment of foreignness of probiotic cultures of *Escherichia coli* M-17 (with pathogenicity island) and *E. coli* LEGM-18 (without pathogenicity island). **Materials and methods.** As dominants reference and clinical strains of bifidobacteria were used in the work, cultures of *E. coli* M-17 and *E. coli* LEGM-18 were taken as associants, differing in the presence of genes which code colibactin. Detection of the phenomenon of microbial discrimination was conducted according to the developed algorithm (Bukharin O.V., Perunova N.B., 2011) based on the principle of metabolite induction as a result of preliminary coinubation of dominants

(bifidobacteria) with supernatant of associants and the formation of feed back in «dominant-associant» pair. Special growth properties, biofilm formation, and antilysozyme activity served as biological characteristics of investigated coliform bacteria. *Results.* Testing of *E. coli* M-17 culture revealed depression of biological properties under investigation and it was estimated as «non-self» possibly due to the presence of pathogenicity island whereas *E. coli* LEGM-18 (without this fragment) sharply strengthened its biological characteristics and was subjected to assessment as «self». *Conclusion.* Use of intermicrobial «self-non-self» discrimination in «dominant-associant» pair is promising as basic method when selecting probiotic strains and cultures for creation of new symbiotic compositions and is suitable for quality control of probiotic products.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 3–9

Key words: intermicrobial «self-non-self» discrimination, metabolites of microorganisms, induction, dominants, associants, bifidobacteria, *Escherichia coli* M-17, *Escherichia coli* LEGM-18, colibactin, probiotics

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что живые организмы, не зависимо от уровня сложности (от прокариот до высших эукариот), имеют системы защиты от чужеродной информации [5, 10]. Механизмы самоидентификации и микробного распознавания в настоящее время активно изучаются на модели роста различных культур бактерий на поверхности агаровых сред [7, 15]. Однако при этом не известно, как будут складываться взаимоотношения микроорганизмов в бульонной культуре, а также с учетом микробных метаболитов в этом процессе, тогда как на значение метаболитов микроорганизмов при формировании межмикробных взаимоотношений, указывали в своей работе Shank A.E. и Kolter R. [14], связывая регуляторные взаимодействия микроорганизмов с наличием в супернатанте «сигнальных» молекул. Это не исключает, что фенотипические изменения микробных популяций при их взаимодействии осуществляются с помощью молекул, которые используются в качестве индукторов новых метаболитов-посредников, оказывающих влияние на формирование антагонистических/синергидных связей микроорганизмов в ассоциации [3].

Использование приема индукции микробными метаболитами в условиях пары «доминант-ассоциант» с последующим определением антагонистических/синергидных типов связей между микросимбионтами способствовало созданию алгоритма микробного распознавания «свой-чужой» на модели микросимбионтов дистального отдела толстого кишечника человека. Разработка метода определения «чужеродности» штаммов микроорганизмов позволила дифференцировать «свои» и «чужие» культуры микросимбионтов среди клинических изолятов бактерий и грибов [2].

Очевидно, что присутствие в супернатанте микроорганизмов факторов, связанных с патогенностью и персистентными свойствами микроорганизмов, значимо для микробного «распознавания», что было выявлено фенотипически в ряде экспериментов. Показано, что наличие токсинов (гемолизина, энтеротоксина) и факторов, обеспечивающих антилизозимный признак энтеробактерий, позволяет доминантной микрофлоре (бифидобактериям) «распознавать» штаммы в качестве «чужеродных» в условиях стабильного подавления параметров репродукции и адаптации микроорганизмов [3]. Однако вопрос о химической природе этих факторов остается открытым. Кроме того, выяснение механизмов феномена микробного распознавания требует создания моделей *in vitro*, основанных на оппозитных штаммах одного и того же вида микроорганизмов, различающихся по своим биологическим характеристикам, метаболическому и генетическому профилю.

В продолжение исследований микробного распознавания «свой-чужой» были

выбраны культуры *Escherichia coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18. Целью данного исследования явилось определение различий в распознавании бифидобактериями «чужеродности» среди штаммов кишечных палочек, различающихся по наличию острова патогенности, кодирующего колибактин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение феномена микробного распознавания проводили по разработанному алгоритму [2], основанному на принципе индукции метаболитов в результате предварительного соинкубирования доминантов (бифидобактерий) с супернатантом ассоциантов и формировании обратной связи в паре «доминант-ассоциант». При этом соинкубирование микробных культур с метаболитами проводили в несколько этапов, оценивая результат по изменению базовых параметров физиологических характеристик микросимбионтов: ростовые свойства (рост/размножение, РС), био пленкообразование (БПО) и антилизоцимная активность (АЛА).

В качестве доминантов использовали эталонные штаммы бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* 791 (№ депонента АС-1247 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИ «Генетика»), *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 (ГИСК им. Л.А.Тарасевича), являющиеся производственными пробиотическими культурами. Также были использованы клинические культуры *Bifidobacterium longum* 505, *Bifidobacterium bifidum* 349, *Bifidobacterium catenulatum* 504, изолированные от пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Выделение и идентификацию бифидобактерий осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями [9].

В качестве культур ассоциантов, в отношении которых изучалась способность бифидобактерий дифференцировать «свои» и «чужие» штаммы, использовали эталонные культуры бактерий *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 (№ депонента В-6240 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика»). Ранее было установлено, что штамм *E. coli* М-17 содержит введенную неконъюгативную, немобилизуемую плазмиду *pColar*, несущую гены продукции колицина Е1 и детерминант устойчивости к ампициллину в дозах до 150 мг/л, а также гены *clbB*, *clbN*, *clbA* и *clbQ*, ассоциированные с образованием генотоксического колибактина [1, 8]. Культура *E. coli* ЛЭГМ-18 была получена от здорового человека, предложена в качестве нового штамма для производства колибактерина (патент РФ № 2065875) и не содержит острова патогенности, кодирующего четырехгенную систему нерибосомального синтеза гибридного пептидополикетидного генотоксина и индуцирующего двухцепочечные разрывы ДНК в эукариотических клетках [12].

При реализации алгоритма «свой-чужой» на 1 этапе исследований штаммы бифидобактерий индуцировали метаболитами *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 методом предварительного соинкубирования. Для этого были получены супернатанты (СН) *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 из «ночных» бульонных культур микроорганизмов. Далее бульонные культуры кишечных палочек центрифугировали (3200 об/мин 15 минут) и пропускали внеклеточную жидкость через мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,2 мкм. Метаболиты кишечной палочки соинкубировали со взвесями бифидобактерий (9×10^8 КОЕ/мл, 3 McF) в соотношении 1:2 в течение 1 часа в CO_2 -инкубаторе (Binder, Германия). В качестве контрольных проб служили штаммы бифидобактерий, к которым вместо супернатантов *E. coli* добавляли питательный бульон в эквивалентном соотношении. После соинкубирования смеси культуры бифидобактерий с метаболитами кишечных палочек ее трижды отмывали физраствором (0,9% NaCl), ресуспендировали в питательном Schaedler-бульоне (BBL, США) и культивировали в течение 48 часов в CO_2 -инкубаторе (Binder, Германия).

На 2 этапе изучали влияние метаболитов индуцированных и контрольных проб

бифидобактерий на биологические свойства (ростовые свойства, биоуплотнение и антилизоцимную активность) изучаемых культур *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18. Для этого из бульонных культур бифидобактерий получали супернатант и добавляли его в соотношении 1:9 в питательный бульон со взвесью кишечных палочек (3 McF). Культивировали штаммы в течение 24 часов при 37°C.

На 3 этапе определяли изменение биомассы культуры (ростовые свойства), способность к образованию биоуплотнения и антилизоцимную активность изучаемых культур кишечных палочек в опытных и контрольных пробах фотометрическим методом на 8-канальном планшетном фотометре ELx808 (BioTek, США). В качестве контроля на каждом этапе исследований вместо СН микроорганизмов использовали эквивалентное количество питательного бульона.

Оценку полученных данных проводили по изменению РС, АЛА и БПО кишечных палочек в сравнении с исходными биологическими характеристиками изучаемых культур, и по снижению изучаемых параметров штаммы относили к «чужим» видам. А при увеличении РС, АЛА и БПО ассоциантов культуры микроорганизмов относили к «своим» видам [2].

Статистическую обработку данных осуществляли методом вариационной статистики из пакета прикладных программ Microsoft Office Excel и программы Биостат путем подсчета М и m; данные по определению регулирующего влияния бифидобактерий на биологические свойства кишечных палочек — непараметрическими методами с применением критерия Манна-Уитни. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке полученных результатов следует обратить внимание на то, что в начале опыта был поставлен контроль изучаемых биологических характеристик *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18. В табл. суммированы эти данные на основании 9 дублей опытов, и оказалось, что различия между изучаемыми культурами были отмечены только в отношении пролиферативной активности бактерий, которая значительно выше была у *E. coli* М-17, где РС составили $0,93 \pm 0,06$ ед \times ОП₄₅₀, тогда как для *E. coli* ЛЭГМ-18 этот показатель был ниже — $0,57 \pm 0,1$ ед \times ОП₄₅₀ ($p \leq 0,05$). Характеристики БПО и АЛА у сравниваемых кишечных палочек существенно не различались. У *E. coli* М-17 эти показатели составили для БПО — $0,3 \pm 0,03$ ед \times ОП₆₃₀, АЛА — $0,52 \pm 0,1$ мкг/мл \times ОП₄₅₀, а для штамма *E. coli* ЛЭГМ-18

Динамика биологических свойств пробиотических культур *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 под воздействием метаболитов бифидобактерий при межмикробном распознавании «свой-чужой»

Исследуемые ассоцианты		<i>E. coli</i> М-17			<i>E. coli</i> ЛЭГМ-18		
		РС, ед. ОП ₄₅₀	БПО, ед. ОП ₆₃₀	АЛА, мкг/мл \times ОП ₄₅₀	РС, ед. ОП ₄₅₀	БПО, ед. ОП ₆₃₀	АЛА, мкг/мл \times ОП ₄₅₀
		контроль 0,93 \pm 0,06	контроль 0,3 \pm 0,03	контроль 0,52 \pm 0,1	контроль 0,57 \pm 0,1	контроль 0,25 \pm 0,09	контроль 0,4 \pm 0,08
Эталонные культуры	<i>B. bifidum</i> № 791 _к	0,94 \pm 0,2	0,33 \pm 0,04	0,87 \pm 0,03*	0,56 \pm 0,07	0,57 \pm 0,004*	0,48 \pm 0,005*
	<i>B. bifidum</i> № 791 _{инд.}	0,76 \pm 0,03**	0,24 \pm 0,02**	0,15 \pm 0,03**	0,75 \pm 0,02*	0,96 \pm 0,03*	0,39 \pm 0,04
	<i>B. adolescentis</i> М-42 _к	0,77 \pm 0,003**	0,28 \pm 0,04	0,53 \pm 0,07	0,55 \pm 0,07	0,37 \pm 0,09*	0,65 \pm 0,1*
	<i>B. adolescentis</i> М-42 _{инд.}	0,65 \pm 0,04**	0,2 \pm 0,02**	0,14 \pm 0,03**	0,7 \pm 0,09*	0,61 \pm 0,05*	1,01 \pm 0,3*
Клинические культуры	<i>B. longum</i> 505 _к	0,9 \pm 0,05	0,27 \pm 0,01	0,48 \pm 0,03	0,63 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02	0,42 \pm 0,03
	<i>B. longum</i> 505 _{инд.}	0,81 \pm 0,03**	0,18 \pm 0,03**	0,22 \pm 0,03**	0,83 \pm 0,04*	0,51 \pm 0,01*	0,87 \pm 0,04*
	<i>B. bifidum</i> 349 _к	0,91 \pm 0,03	0,22 \pm 0,04**	0,33 \pm 0,04**	0,61 \pm 0,02	0,35 \pm 0,04*	0,42 \pm 0,02
	<i>B. bifidum</i> 349 _{инд.}	0,89 \pm 0,01	0,2 \pm 0,1**	0,24 \pm 0,01**	0,74 \pm 0,1*	0,32 \pm 0,02*	0,65 \pm 0,06*
	<i>B. catenulatum</i> 504 _к	0,94 \pm 0,1	0,31 \pm 0,05	0,6 \pm 0,05	0,94 \pm 0,05*	0,75 \pm 0,03*	0,38 \pm 0,01
	<i>B. catenulatum</i> 504 _{инд.}	0,78 \pm 0,02**	0,12 \pm 0,06**	0,37 \pm 0,01**	0,71 \pm 0,03*	0,54 \pm 0,07*	0,45 \pm 0,07

Примечание. Отсутствие индекса — нейтрал., * синергизм, ** антагонизм ($p \leq 0,05$).

— $0,25 \pm 0,09$ ед \times ОП₆₃₀ и $0,4 \pm 0,08$ мкг/мл \times ОП₄₅₀ соответственно. Таковы были исходные биологические характеристики изучаемых культур.

На следующем этапе опытов было оценено влияния метаболитов интактной бифидофлоры на биологические характеристики изучаемых штаммов (еще один контроль), а в последующем было определено воздействие индуцированной бифидофлоры метаболитами ассоциантов на изучаемые характеристики *E. coli* М-17 и ЛЭГМ-18. Результаты представлены в табл.

Оценивая культуру *E. coli* М-17, следует отметить негативное отношение к ней (подавление изучаемых признаков) со стороны индуцированной нормофлоры эталонных культур — *B. bifidum* № 791_{инд} и *B. adolescentis* МС-42_{инд}. Интересно, что в целом сходно повели себя и наши клинические штаммы *B. longum* 505_{инд}, *B. bifidum* 349_{инд} и *B. catenulatum* 504_{инд}, что позволяет отнести *E. coli* М-17 к «чужим» видам, хотя она использовалась в коммерческом препарате колибактерин в прошлом. Что касается результатов оценки культур с использованием интактных метаболитов бифидофлоры в отношении ассоциантов (промежуточный контроль), то изучение *E. coli* ЛЭГМ-18 (без острова патогенности) не вызывало нареканий, что эта культура — «своя» и не имеет признаков «чужеродности», что демонстрирует *B. bifidum* № 791_к, не проявляя выраженного антагонизма. То же можно сказать и о другой эталонной культуре — *B. adolescentis* МС-42_к, проявляющей четко выраженный синергизм в отношении *E. coli* ЛЭГМ-18. Не проявляли выраженного антагонизма в отношении кишечной палочки ЛЭГМ-18 и клинические культуры (даже на промежуточном контрольном этапе) *B. longum* 505_к, не говоря уже о *B. longum* 505_{инд}. То же следует сказать о *B. bifidum* 349_к и *B. catenulatum* 504_к.

Полученные материалы позволяют заключить, что использование метода межмикробного определения «свой-чужой» позволяет отнести *E. coli* М-17 к штаммам, имеющим признаки «чужеродности», тогда как *E. coli* ЛЭГМ-18 лишена их.

ОБСУЖДЕНИЕ

Концепция «своего» тесно связана с процессами самоидентификации и саморегуляции биологической системы любого уровня организации. В настоящее время актуальным направлением исследований межмикробных взаимодействий является определение индукции метаболитов микроорганизмов в их ассоциации. Наличие систем, осуществляющих телесенсинг состояния окружающей среды (наличие питательных веществ, хемоаттрактантов и др.) предполагает, что микроорганизмы координируют свое «поведение» в контексте сложившихся условий. Изменение химических или физических параметров индуцирует продукцию специфических молекул, что позволяет бактериям адаптироваться к внешним условиям [13].

Проведенные ранее эксперименты по взаимодействию микроорганизмов в ассоциации наводят на мысль, что в регуляции межмикробных взаимоотношений при функционировании микросимбиоза важную роль играют метаболиты, оказывающие регуляторное действие на биологические свойства микросимбионтов [3].

В данной работе были выявлены особенности регуляторного влияния в отношении модельных штаммов *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 как у бифидобактерий из контрольных проб, так и у индуцированных метаболитами тест-культур, заключающиеся в преимущественном усилении исследуемых биологических характеристик у *E. coli* ЛЭГМ-18 и подавлении у *E. coli* М-17, которые усиливались или появлялись у индуцированных культур бифидобактерий. По-видимому, наблюдаемые различия при действии штаммов *E. coli*, различающихся по наличию генотоксин-кодирующего острова патогенности, могут быть связаны с много-

функциональной ролью низкомолекулярных пептид-поликетидных соединений, тесно связанных с системами сидерофоров [11]. Известно, что эти молекулы имеют широкое адаптивное значение для множества микроорганизмов в условиях конкуренции за ионы многовалентных металлов [4, 6], детекция которых, таким образом, может играть важную роль в межвидовой коммуникации бактерий в системе распознавания «свой-чужой». Полученные результаты свидетельствуют, что данные низкомолекулярные пептид-поликетидные соединения могут являться одними из кандидатов на роль маркеров «чужеродности» микросимбионтов, значимых при микробном распознавании, что требует дальнейших исследований в этом направлении.

Кроме того, учитывая тот факт, что в экспериментах *in vitro* нами были использованы эталонные штаммы бифидобактерий, являющиеся производственными культурами пробиотиков, полученные данные открывают перспективу использования микробного распознавания «свой-чужой» в качестве базового метода при отборе пробиотических препаратов и штаммов микроорганизмов для создания новых синбиотических композиций.

Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований УрО РАН — проект № 15-5-4-7 «Роль бифидофлоры в формировании гомеостаза человека» и проект № 15-3-4-36 «Механизмы микробной регуляции ассоциативного симбиоза при инфекции»; фонда РГНФ — проект № 16-16-56004 «Клинико-микробиологическое обоснование новых подходов к профилактике развития патологии опорно-двигательного аппарата на основе изучения их факторов риска у детей Оренбуржья».

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Фиалкина С.В. Наличие генов генотоксина, ассоциированных с *pks* островом патогенности, у пробиотического штамма *Escherichia coli* M-17. Журн. микробиол. 2012, 5: 25-27.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микробное распознавание «свой-чужой» в условиях кишечного микросимбиоза человека. Журн. микробиол. 2011, 6: 46-51.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014.
4. Бухарин О.В., Сгибнев А.В. Влияние метаболитов коринебактерий на антагонистическую активность H_2O_2 -продуцирующих лактобацилл. Журн. микробиол. 2012, 4: 48-51.
5. Марков А.В., Куликов А.М. Гипотеза «иммунологического тестирования» партнеров — системы распознавания «своих» и «чужих» в исторической перспективе. Известия РАН. Серия биологическая. 2006, 4: 389-403.
6. Сгибнев А.В. Механизмы выживания бактерий в условиях окислительного стресса и дефицита ионов железа. Журн. микробиол. 2006, 4: 20-22.
7. Gibbs K. A., Urbanowski M.L., Greenberg E.P. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. Science. 2008, 321 (5886): 256-259.
8. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A. et al. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* *pks* genomic island. J. Clin. Microbiol. 2008, 46 (12): 3906-3911.
9. Jousime-Somers H., Summanen P. et al. Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing; 2002.
10. Lypez-Larrea C. (ed.). Self and nonself. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. Adv. Experiment. Med. Biology. 2012, 738.
11. Martin P., Marcq I., Magistro G. et al. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. PLoS Pathog. 2013, 9 (7): e1003437. doi:10.1371/journal.ppat.1003437.
12. Nougayrède J.P., Homburg S., Taieb F. et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science. 2006, 313 (5788): 848-851.
13. Roux A., Payne S.M., Gilmore M.S. Microbial telesensing: probing the environment for friends, foes, and food. Cell Host Microbe. 2009, 6 (2): 115-124.

14. Shank A. E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009, 12 (2): 205-214.
15. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L. et al. Two independent pathways for self-recognition in proteus mirabilis are linked by type VI-dependent export. *mBio.* 2013, 4 (4): e00374-13. doi:10.1128/mBio.00374-13.

Поступила 12.03.16

Контактная информация: Бухарин Олег Валерьевич, д.м.н., проф.,
460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11, р.т. (3532)77-54-17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

С.Б.Чекнёв, Е.И.Вострова, М.А.Сарычева, А.В.Востров

ТОРМОЖЕНИЕ РОСТА БАКТЕРИЙ В КУЛЬТУРАХ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA КАТИОНАМИ МЕДИ И ЦИНКА, ПРИМЕНЕННЫМИ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Оценка антибактериального действия связанных белками γ -глобулиновой фракции и свободных катионов меди и цинка, примененных в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* в физиологических (микромольных) концентрациях. *Материалы и методы.* Суточную культуру бактерий *S.aureus* или *P.aeruginosa* переводили с агара в физиологический раствор и готовили суспензию клеток, содержащую ориентировочно $10^3 - 10^4$ КОЕ/мл. В суспензию вносили образцы металлокомплексов γ -глобулина с катионами меди или цинка (белка 30 или 45 мкг/мл), контрольные γ -глобулины (30 или 45 мкг/мл) и солевые растворы меди или цинка, содержание катионов в которых соответствовало количеству металла, связавшегося с белком на этапе получения металлокомплексов (75 нг/мл). Суспензии инкубировали при 37°C в течение 6 час, через каждые 2 час производя отбор проб и подсчет КОЕ в соответствии с принятым микрометодом. По окончании инкубации (6 ч наблюдения) суспензии переводили в питательный бульон, термостатировали в течение суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным (стерильным). *Результаты.* Начиная с 3 часа наблюдения в культуре *S.aureus* обнаруживается токсическое действие катионов цинка и меди. Жизнеспособные бактерии отсутствуют в культуре с цинком спустя 6 час, с медью — спустя 4 час инкубации. Связавший катионы меди γ -глобулин на сроках 4 и 6 час инкубации на 11,9 — 33,0% ($p < 0,05 - 0,1$) снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным белком. В культуре *P.aeruginosa* токсическое действие катионов меди проявляется сразу же после инициации культуры и приводит к реализации полного бактерицидного эффекта спустя 4 час наблюдения. Катионы цинка подобными свойствами не обладают. Связавший катионы меди γ -глобулин на сроках 4 и 6 час инкубации на 19,3 — 25,8% ($p < 0,001$) снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным белком. *Заключение.* Поддерживаемые в физиологическом растворе бактерии *S.aureus* подвержены токсическому действию физиологических (микромольных) концентраций свободных катионов меди и цинка, а также катионов меди, связанных человеческим сывороточным γ -глобулином. В тех же условиях бактерии *P.aeruginosa* испытывают токсическое воздействие катионов меди (но не цинка) как свободных, так и связанных человеческим сывороточным γ -глобулином. При этом в присутствии свободных катионов меди в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* реализуется полный бактерицидный эффект.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 9—18

Ключевые слова: антибактериальное действие, медь, цинк, *S.aureus*, *P.aeruginosa*