

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ PSEUDOMONAS AERUGINOSA С БАКТЕРИЯМИ III–IV ГРУППЫ ПАТОГЕННОСТИ

STUDY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA INTERACTION WITH PATHOGENICITY GROUP III–IV BACTERIA

N. Gandraburova
E. Harina
E. Bondar
A. Gadjiakhmedova
A. Seropova
A. Goncharenko

Summary. The article addresses the interaction of pathogenic and conditionally pathogenic microflora in microbiocenosis. The interaction of *Pseudomonas aeruginosa* strain with such opportunistic microorganisms as *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus* was studied. The choice of microorganisms is associated with their wide distribution, they are frequent representatives of the dermal, oral and intestinal microflora of people, participate in the formation of biofilms. It was revealed that *Pseudomonas aeruginosa* does not have antagonistic properties in relation to the test strains of *St. aureus* and *C. albicans*, as well as its suppressive effect on test strains of *E. coli* and *Al. faecalis* was noted.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antagonism, pathogenicity, cultivation, biofilm.

Гандрабунова Надежда Ивановна

Доцент, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
 nadivgan@mail.ru

Харина Елена Ивановна

Доцент, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
 euphorbia@mail.ru

Бондарь Елена Васильевна

Доцент, ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
 evbondar68@gmail.com

Гаджирахмедова Айшат Гаджиевна

Ведущий специалист, ОАО НПК «ЭСКОМ»
 ayshat.gadzhiakhmedova@gmail.com

Серопова Александра Сергеевна

Ставропольский государственный медицинский университет
 gandraburova_sasha@mail.ru

Гончаренко Анастасия Олеговна

Аспирант, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»
 aogoncharenko97@gmail.com

Аннотация. В статье затронуты вопросы взаимодействия патогенной и условно-патогенной микрофлоры в микробиоценозе. В работе изучено взаимодействие штамма *Pseudomonas aeruginosa* с такими условно-патогенными микроорганизмами как *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus*. Выбор микроорганизмов связан с их широким распространением, они являются частыми представителями дермальной, оральной и кишечной микрофлоры людей, участвуют в формировании биопленки. Выявлено, что *Pseudomonas aeruginosa* не обладает антагонистическими свойствами по отношению к тест-штаммам *St. aureus* и *C. albicans*, а так же отмечено ее подавляющее действие на тест-штаммы *E. coli* и *Al. faecalis*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, синегнойная палочка, антагонизм, патогенность, культивирование.

Род *Pseudomonas* широко распространен в природе. Представители этого рода встречаются в почве, воздухе, пресноводных и морских водах, а также на коже и слизистых оболочках теплокровных животных, внутри их организмов, на поверхности растений в их ризосфере. Такая экологическая пластичность объясняется их способностью усваивать самые разнообразные по природе соединения. Псевдомона-

ды являются убиквидами — организмами, способными занимать различные экологические ниши [5].

P. aeruginosa относится к семейству *Pseudomonadaceae*. *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) грамтрицательная подвижная палочка, выраженный хемоорганотроф, строгий аэроб. Несмотря на то, что *Ps. aeruginosa* является основным

возбудителем псевдомонадных инфекций человека эта палочка входит в состав нормальной микрофлоры человека (выявляется у здоровых людей на коже паховой и подмышечных областей, ушей, на слизистой носа и глотки, в желудочно-кишечном тракте).

История открытия этого микроорганизма связана с описанием синегнойной инфекции Люке в 1862 г., который отмечал сине-зеленый цвет перевязочного материала. Первая вспышка гнойной инфекции, вызванная *Pseudomonas aeruginosa*, зарегистрирована в 1897 г., а уже спустя два года С.Н. Серковский, изучая особенности данной инфекции указывал, что синегнойная палочка свои патогенные свойства бактерии проявляет чаще в организме лиц с ослабленным иммунитетом [3, 8].

Патогенность *P. aeruginosa* обусловлена наличием факторов вирулентности, способствующих адгезии, инвазии и персистенции в тканях, цитотоксичности и стимуляции системного воспалительного ответа. *Pseudomonas aeruginosa* способна вызывать очаговые инфекционно-воспалительные процессы в органах и в системах органов, что связано с наличием у *P. aeruginosa* адгезинов, ферментов (нейраминидаза, гемолизина, протеазы и др.), она способна эффективно заселять в различные биотопы микроорганизма [2, 3, 7].

Стоит отметить, что синегнойная палочка в экотопах и очагах воспаления находится не изолированно, а в микробиоценозах. При этом между различными микроорганизмами формируются как симбиотические, так и конкурентные взаимоотношения [1, 2].

Последнее время появляются новые сведения о наличии сигнальной системы «quorum sensing», регулирующей продукцию факторов патогенности и способность к образованию биопленок, а также данные о особенностях механизмов развития устойчивости условно-патогенных бактерий к антибиотикам [4].

Сегодня отмечается рост числа заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Это связано с одной стороны с увеличением воздействия на организм неблагоприятных внешних факторов различной этиологии (антропогенного загрязнения окружающей среды, стрессов и др.), с другой стороны с развитием резистентных штаммов микроорганизмов, как следствия бесконтрольного приема антибиотиков [4, 6]. *Pseudomonas aeruginosa* способны выдерживать мощное антропогенное давление. Имея широкий спектр ферментов и плазмид, они быстро адаптируются в меняющихся условиях среды обитания. Экологические последствия этих изменений еще выявлены. Такого рода приспособления могут сопрягаться с при-

обретением микроорганизмами признаков, представляющих опасность для гидробионтов, наземных организмов и человека [3].

Целью исследования явилось изучение взаимодействия штамма *Pseudomonas aeruginosa* с некоторыми условно-патогенными микроорганизмами: *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus*.

Выбор микроорганизмов для исследования обусловлен их широким распространением, к тому же это частые представители дермальной, оральной и кишечной микрофлоры человека они также участвуют в формировании биопленки [1].

В работе использовались штаммы:

1. *Pseudomonas aeruginosa* № 27/99 (синегнойная палочка), номер штамма 190087;
2. *Alcaligenes faecalis* № 415, номер штамма 242484;
3. *Candida albicans* ATCC24433, номер штамма 303901;
4. *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P = FDA 209-P = NCTC7447 = CCM 2022 = CIP 53.156 = WDCM 00033, номер штамма 201108;
5. *Escherichia coli* ATCC25922 (F-50) = NCTC12241 = CCM 3954 = CIP 76.24 = WDCM 00013, номер штамма 240533.

Исследования осуществлялись методами перпендикулярных штрихов и агаровых блочков. Метод перпендикулярных штрихов заключался в посеве *P. aeruginosa* штрихом на поверхность агаровой среды в чашке Петри. Тестируемые штаммы микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus*) сеялись перпендикулярно штриху. Культивирование исследуемых образцов проводилось в аэробном термостате при t-35°C в течение 20–24 часов. Оценка взаимодействия штамма *Pseudomonas aeruginosa* с тестируемыми условно-патогенными микроорганизмами проводилась после учета зон роста культур. Если изучаемый организм оказывает антимикробное действие, то тест-культура микроорганизмов растёт вдали от штриха антагониста. Нечувствительные микроорганизмы развиваются в непосредственной близости от штриха изучаемого организма.

Метод агаровых блочков предполагает посев изучаемой культуры сплошным «газоном» на поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Через 24 часа культивирования в термостате из получившегося «газона» в асептических условиях вырезались блочки (диаметром 4–5 мм) и переносились на засеянную тест-орга-

Таблица 1. Результаты изучения взаимодействия *P. aeruginosa* с *E. coli*, *St. aureus*, *Al. faecalis*, *C. albicans* методом перпендикулярных штрихов через 12 и 24 часа культивирования, n=40

Тест-культуры	Расстояние от штриха <i>P. aeruginosa</i> до штриха тест-культуры, ± мх* (mm)	
	12 ч культивирования	24 ч культивирования
<i>E. coli</i>	13,0 ± 0,3	11,0 ± 0,2
<i>St. aureus</i>	3,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1
<i>Al. faecalis</i>	12,0 ± 0,3	10,0 ± 0,2
<i>C. albicans</i>	1,0 ± 0,2	0

*мх — относительная погрешность измерения.

Таблица 2. Результаты изучения взаимодействия *P. aeruginosa* с *E. coli*, *St. aureus*, *Al. faecalis*, *C. albicans* методом агаровых блоков через 24 часа культивирования, n=84

Тест-культуры	Зона задержки роста, ± мх* (mm)	Зона стимуляции роста, ± мх* (mm)	Контроль ± мх* (mm) — зона роста <i>P. aeruginosa</i> на питательной среде от края блока
<i>E. coli</i>	-	14,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3
<i>St. aureus</i>	1,0 ± 0,2	0	
<i>Al. faecalis</i>	-	10,0 ± 0,2	
<i>C. albicans</i>	0	0	

*мх — относительная погрешность измерения.

низмами поверхность другой агаровой среды. Дальнейшее культивирование чашек с агаровыми блочками осуществлялось в аэробном термостате 20–24 часа. В случаях, когда выделяемый организмом антибиотик подавлял развитие тест-культуры микроорганизмов, то вокруг агарового блочка формировалась зона отсутствия роста.

Экспериментальная часть исследования реализовывалась на базе Научно-производственного концерна ОАО НПК «ЭСКОМ» (г. Ставрополь), анализ результатов проводился на базовой кафедре микробиологии медико-биологического факультета Северо-Кавказского федерального университета в период с 2021 по 2022 год.

Статистическую обработку полученных результатов исследований оформляли с использованием прикладных программных пакетов «Statistica for Windows», версия 6.0, и программного продукта «Microsoft Excel 2016».

Эксперимент проводили в два этапа. На I этапе штаммы микроорганизмов ОАО НПК «ЭСКОМ» реактивировали в течение суток в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322–08» утвержденными постановлением глав-

ного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2008 года № 4: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Al. faecalis*, *St. aureus* при температуре +35°C, *C. albicans* при температуре +25°C. Затем изучали взаимодействие микроорганизмов, используя метод перпендикулярных штрихов. *P. aeruginosa* высевали полоской на поверхность агаровой среды и перпендикулярно штриху подсеивали штаммы тест-культур (*E. coli*, *St. aureus*, *Al. faecalis*, *C. albicans*). Чашки выдерживали в термостате при температуре +35° С.

Расстояние от штриха *P. aeruginosa* до штриха изучаемой тест-культуры измеряли через 12 ч и 24 ч культивирования с точностью до 1 мм. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Расстояние от штриха *P. aeruginosa* до штриха тест-культуры *E. coli* составило через 12 ч культивирования 13,0 ± 0,3 мм и 11,0 ± 0,2 мм через 24 ч, до штриха тест-культуры *Al. faecalis* — через 12 ч культивирования 12,0 ± 0,3 мм и 10,0 ± 0,2 мм через 24 ч. Обнаружено подавляющее действие *P. aeruginosa* на *E. coli* и *Al. faecalis*.

На II этапе изучали взаимодействие микроорганизмов, используя метод агаровых блоков [7, 8]. Контролем служили чашки с блоками *P. aeruginosa*, помещенными на питательную среду без тест-культур. Результаты

учитывали по наличию или отсутствию зоны задержки/стимуляции роста вокруг блока с *P.aeruginosa*. Результаты представлены в таблице 2.

Вокруг блоков с *P. aeruginosa* через 24 часа культивирования на питательных средах в чашках, засеянных как *St. aureus*, так и *C. albicans* зоны подавления или стимуляции одного микроорганизма другим не обнаружено. Отмечено взаимодействие *P.aeruginosa* с тест-культурами *E.coli* и *Al.faecalis*. На чашках засеянных тест-культурой *E.coli* культура синегнойной палочки разрослась от края блока в диаметре до $14,0 \pm 0,3$ мм, что на $11,0$ мм больше, чем в контроле. На чашках засеянных тест-культурой *Al.faecalis* культура си-

нежной палочки разрослась от края блока в диаметре до $10,0 \pm 0,2$ мм, что $7,0$ мм больше, чем в контроле.

В ходе изучения взаимодействия *Pseudomonas aeruginosa* с бактериями III–IV группы патогенности выявили, что данная культура не обладает антагонистическими свойствами по отношению к *St.aureus* и *C.albicans*. Однако отмечено, что синегнойная палочка оказывает подавляющее действие на тест-культуры *E.coli* и *Al.faecalis*. Зафиксирована стимуляция роста синегнойной палочки тест-культурами, о чем свидетельствует зона роста *Pseudomonas aeruginosa* от края блока, превышающая контроль на $11,0$ и $7,0$ мм соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алыбаева А.Ж. Межмикробные взаимодействия в бактериально-грибковых ассоциациях условно-патогенных микроорганизмов / А.Ж. Алыбаева, Е.А. Олейникова, М.Е. Елубаева // Вестник Науки и Творчества. — 2020. — № 7(55). — С. 19–25.
2. Антагонистические взаимоотношения *Pseudomonas aeruginosa* с грамотрицательными бактериями / В.А. Гриценко, Т.М. Мругова, П.П. Курлаев [и др.] // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. — 2016. — № 4. — С. 5.
3. Бороздина И.Б. Сравнительная характеристика бактерий рода *Pseudomonas* при культивировании на искусственных питательных средах / И.Б. Бороздина // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2010. — № 2. — С. 67–71.
4. Помыткина, Т.Е. Новые сведения о формировании механизмов антибиотикорезистентности / Т.Е. Помыткина, В.К. Борзенков // Психология. Спорт. Здравоохранение: сборник избранных статей по материалам Международной научной конференции, Санкт-Петербург, 27 февраля 2021 года. — Санкт-Петербург: Частное научно-образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Гуманитарный национальный исследовательский институт «НАЦРАЗВИТИЕ», 2021. — С. 30–32.
5. Псевдомонады. Род *Pseudomonas*. Синегнойная палочка. Эпидемиология синегнойной палочки. Распространенность синегнойной палочки. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: — <https://meduniver.com/Medical/Microbiology/454.html> (Дата обращения: 10.11.2021)
6. Роль системы секреции III типа в развитии госпитальных инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* / Н.А. Зигангирова, Л.Н. Нестеренко, Л.Н. Капотина [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2017. — Т. 19. — № 1. — С. 4–10.
7. Arzanlou, M. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gramnegative bacteria // M. Arzanlou, W.C. Chai, H. Venter // Essays In Biochemistry. — 2017. — Vol. 61, No. 1. — P. 49–59. DOI: 10.1042/EBC20160063.
8. Hirabayashi, A. Risk factors for and role of OprD protein in increasing minimal inhibitory concentrations of carbapenems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / A. Hirabayashi, D. Kato, Y. Tomita, M. Iguchi, K. Yamada, Y. Kouyama, T. Yagi // Journal of Medical Microbiology. — 2017. — Vol. 66, No 11. — P. 1562–1570. DOI: 10.1099/jmm.0.000601.

© Гандрабурова Надежда Ивановна (nativgan@mail.ru), Харина Елена Ивановна (euphorbia@mail.ru),
Бондарь Елена Васильевна (evbondar68@gmail.com), Гаджихмедова Айшат Гаджиевна (ayshat.gadzhiahmedova@gmail.com),
Серопова Александра Сергеевна (gandrabuova_sasha@mail.ru), Гончаренко Анастасия Олеговна (aogoncharenko97@gmail.com).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»