

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОЦЕНКА ФАКТОРОВ ПЕРСИСТЕНЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Бугеро Нина Владимировна

доктор биологических наук, профессор
Псковский государственный университет
г. Псков

Ильина Наталья Анатольевна

доктор биологических наук, профессор
Псковский государственный университет
г. Псков

ASSESSMENT OF MICROBIAL PERSISTENCE FACTORS

Bugero Nina Vladimirovna

doctor of biological Sciences, professor
Pskov state University, Pskov

Irina Natalia Anatolyevna

doctor of biological Sciences, professor
Pskov state University, Pskov

АННОТАЦИЯ

В работе приведены данные о динамике персистентных характеристик (АЛА, АГА и АЛФА) энтерококков в процессе сокультивирования с простейшими *Blastocystis hominis*. Обнаружение персистентных характеристик энтерококков в монокультуре и изменение их показателей при сокультивировании с простейшими бластоцистами пополняет изучаемый спектр механизмов, обеспечивающих симбиотические связи в протозойно-бактериальных ассоциациях.

ABSTRACT

The paper presents data on the dynamics of persistent characteristics (ALA, AGA and alpha) of enterococci in the process of co-cultivation with the simplest *Blastocystis* spp. The detection of persistent characteristics of enterococci in monoculture and changes in their indicators during co-cultivation with protozoan blastocysts adds to the studied range of mechanisms that provide symbiotic connections in protozoan-bacterial associations.

Ключевые слова: *Blastocystis hominis*, энтерококки, симбиотические связи, персистенция, антилизосомная, антигистонозная, антилактоферриновая активности.

Keywords: *Blastocystis hominis*, enterococci, symbiotic relationships, persistence, anti-lysozyme, antihistone, anti-lactoferrin activity.

Введение. В последние десятилетия различными научными школами простейшие изучаются как хозяева возбудителей ряда инфекционных заболеваний [4,с.13].

Анализ литературных данных и наши собственные исследования показали, что довольно часто в микробиоценозах кишечника человека разных групп населения встречаются простейшие *Blastocystis hominis*, которые активно принимают участие в формировании паразитоценоза. Доказано, что наличие бластоцист в кишечнике в ассоциации с другими микроорганизмами могут приводить к различным формам дисбактериоза [7,с.97].

Проведенные нами исследования показали, что довольно часто у людей инвазированных бластоцистами выявляются бактерии рода *Enterococcus* (*E.faecalis*), входящие в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта человека, играя важную роль в обеспечении колонизационной резистентностью слизистых. В то же время они являются представителями группы условно-патогенных бактерий, способных вызывать аутоинфекцию.

Выявлена возможность поддержания численности ряда бактерий при взаимодействии с простейшими и регуляции в результате внутриклеточного паразитирования некоторых их свойств, в частности к устойчивости фагоцитоза [2,с.178], антилизосомной активности и др. Однако сведения об усилении факторов персистенции бактерий в результате взаимодействия с простейшими носят отрывочный характер. Это обстоятельство определило актуальность изучения роли персистентных свойств бактерий рода *Enterococcus* в ассоциации с простейшими бластоцистами.

Материалы и методы. В настоящей работе использованы 90 штаммов *Enterococcus faecalis* и 118 штаммов *Blastocystis hominis*, выделенных от людей с патологией кишечника и желчевыводящих путей. Данные штаммы были определены для исследования как наиболее часто встречающиеся сочетания условно- патогенных бактерий с простейшими *B. hominis*. Используемые штаммы бактерий были идентифицированы по морфологическим, тинкториальным и

биохимическим свойствам с помощью коммерческих тест-систем фирмы «Lachema» (Чехия). Выявление бластоцист производили в ходе микробиологического анализа испражнений людей. Для культивирования бластоцист использовали среду Suresh (1993). По описанным методикам изучали наличие у энтерококков факторов персистенции: антилизоцимной (АЛА) [1, с.27-39], антилактоферриновой (АЛФА) [3, с.64-67] и антигистоновой активности (АГА) [6, с.35-40] в монокультуре и при сокультивировании с простейшими бластоцистами.

Достоверность выявленных различий оценивали с использованием критерия Стьюдента [5, с.257].

Результаты и их обсуждения. Анализ выраженности персиситентных характеристик у штаммов *E.faecflis* показал, что более 80% (70) культур обладают АЛА. Среднее значение АЛ признака составило $2,3 \pm 0,02$ мкг/мл. На долю штаммов с высокими значениями признака ($2,7 \pm 0,05$ мкг/мл) приходилось 28,5% (20) культуры, со средними и низкими значениями ($2,1 \pm 0,02$ мкг/м и $1,7 \pm 0,03$ мкг/мл), что составило 38,5% (27) и 33,0% (23) культура соответственно.

Из 90 исследуемых культур *E.faecalis* 87 (97%) обладали антилактоферриновой активностью. Выраженность АЛФА в популяциях *E.faecalis* колебалась в пределах 54-121 нг/мл (табл/ 1).

Таблица 1.

Частота встречаемости и выраженность АЛФА штаммов *E.faecalis*

Показатели АЛФА (нг/мл)	Обследуемые лица	
	Количество штаммов, обладающих АЛФА	% штаммов, обладающих АЛФА
54-70	13	15,0
71-86	55	48,3
87-121	19	36,7
Всего штаммов	87	100

Максимальные значения антилактоферриновой активности ($87-121 \pm 0,05$ нг/мл) проявляли 36,7% штаммов *E.faecalis*. Средними значениями изучаемого признака, равной $71-86 \pm 0,03$ нг/мл, обладало 48,3% штаммов энтерококков. Минимальные показатели АЛФА ($54-70 \pm 0,01$ нг/мл) отмечены у 15% исследуемых культур.

При анализе АГА энтерококков установлено, что этот признак проявлялся не у всех штаммов исследуемых культур *E.faecalis* и был обнаружен лишь в 30% случаев (26 штаммов). Большая часть культур *E.faecalis* имела средние и низкие значения изучаемого признака, их величина составила $2,8-4,0 \pm 0,05$ мкг/мл – 15 культур (57,7%) и $1,7-2,8 \pm 0,05$ мкг/мл – 11 культур (42,3%) соответственно.

В качестве воздействующих культур были выбраны штаммы простейших *B.hominis*, выделенные из фекалий больных с заболеваниями кишечника и желчевыводящих путей. Чистые культуры бластоцист проявляли антилизоцимную активность в пределах 2 - 5 мкг/мл, антилактоферриновую от 62-302 нг/мл и антигистоновую активность от 4,3 до 7,1 мкг/мл.

Сокультивирование простейших и бактерий энтерококков проводили в течение 36 часов, затем анализировали изменение персиситентных свойств микроорганизмов.

При сокультивировании с простейшими бластоцистами антилизоцимная активность *E.faecalis* составила в среднем $2,7 \pm 0,02$ мкг/мл ($p < 0,01$) (до сокультивирования показатель был равен $2,3 \pm 0,02$ мкг/мл). В 75,7% наблюдалось повышение свойства в среднем в 2,8 раза, снижение способности в 1,8 раза к инаktivации лизоцима проявилось у 18,3 (6,71%) штаммов энтерококков от исходного уровня ($p < 0,05$), без явных изменений

оставались 6% исследуемых культур энтерококков.

Динамика изменения АЛФА показала следующие результаты. У штаммов *E.faecalis* до начала эксперимента АЛФА проявлялась на уровне 56-121 нг/мл. В популяции этих бактерий, выделенных из сокультивировавшихся с ними простейших *B.hominis*, регистрировались штаммы с уровнем АЛФА $63 \pm 0,02$ нг/мл – $87 \pm 0,02$ нг/мл (10%) культур, $87 \pm 0,02$ нг/мл – $111 \pm 0,05$ нг/мл (20%) культур, $111 \pm 0,05$ нг/мл – $134 \pm 0,07$ нг/мл (50%) штаммов и индифферентный эффект имели 20,0% *E.faecalis*. Как показывают данные эксперимента повышение свойства происходило более, чем у 80% культур. В результате сокультивирования *E.faecalis* с бластоцистами штаммы бактерий повышали свою активность, в то время как снижение значений изучаемого признака не происходило.

Антигистоновая активность *E.faecalis* при сокультивировании с бластоцистами повышалась, в среднем, до $4,5 \pm 0,05$ мкг/мл (до сокультивирования показатель был равен $3,2 \pm 0,02$ мкг/мл) ($p > 0,05$). Повышение АГА отмечалось у 17 культур (65,3%) из 26, обладающих АГА до сокультивирования с бластоцистами от исходного значения, снижение признака - у 7 штаммов (27,0%) ($p < 0,05$) и 2 штамма (7,7%) культуры проявляли индифферентный характер в отношении АГА.

Заключение. Таким образом, обнаруженная нами в процессе сокультивирования с простейшими бластоцистами динамика персиситентных характеристик (АЛА, АГА и АЛФА) бактерий энтерококков говорит о механизме взаимодействия в системе типа эукариот – прокариот, позволяющих энтерококкам сохраняться и накапливаться в протозойно-бактериальных ассоциациях. С этой точки зрения наличие антилизоцимной, антилактоферриновой и

антигистоновой активности у бактерий-ассоциантов простейших обеспечивает им защиту от лизоцима, белков – лактоферрина и гистонов эукариот, способствует реализации межмикробных взаимодействий. Обнаружение персистентных характеристик энтерококков в монокультуре и изменение их показателей при сокультивировании с простейшими бластоцистами пополняет изучаемый спектр механизмов, обеспечивающих симбиотические связи в протозойно-бактериальных ассоциациях.

Список литературы.

1. Бухарин О.В. Метод определения антилизосимной активности микроорганизмов // Журнал микробиология. 1984. №2. С.27-39.
2. Бухарин О.В. Микросимбиоз. Екатеринбург, 2014. 260 с.
3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. –М.: Медицина, 1999.
4. Грицок, О.В., Продеус, Т.В., Максимова, М.С., Садыкова, В.Д. «О вариабельности изолятов *Blastocystis species*, поддерживаемых *in vitro*» // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2017. № 3. С. 12–18.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия (учебное пособие для биологических специальностей университетов) – М., высшая школа, 1990.
6. Немцева Н.В., Плотников А.О., Яценко-Степанова Т.Н. и др. Вестник ОГУ. 2005, 5 (43): 35 – 40. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов // Журн. Микробиол. – 2003. -№4. – С.64-67.
7. Потатуркина-Нестерова Н.И., Квасова Н.А., Нестеров А.С. Бластоцистная инвазия и дисбактериоз кишечника (монография) // г. Ульяновск: УлГУ, 2003. 211 с.