

ОБОСНОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ АНТИЛИЗОЦИМНОЙ АКТИВНОСТИ И РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ЭНТЕРОКОККОВ ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С ПРОСТЕЙШИМИ *BLASTOCYSTIS HOMINIS*

Бугеро Н.В.

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия (432025, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 12), e-mail: nbugero@mail.ru

В настоящей работе представлены результаты изучения персистентного потенциала у штаммов энтерококков, выделенных при дисбиозе кишечника, и изучена взаимосвязь антилизоцимной активности и репродуктивной функции энтерококков при сокультивировании с простейшими *Blastocystis hominis*. Полученные результаты позволяют говорить, что продуцирование микроорганизмами антилизоцимного фактора является, скорее, прерогативой стационарных, нежели активно делящихся бактериальных клеток. Установлена зависимость более медленного роста штаммов энтерококков с высокими значениями изучаемого признака по сравнению с низкоактивными. Это свидетельствует об интеграции антилизоцимного признака с факторами, определяющими ингибирование развития бактериальной популяции и контролирующими накопление биомассы бактерий.

Ключевые слова: *Blastocystis hominis*, энтерококки, персистентный потенциал, антилизоцимная активность, репродуктивная функция энтерококков.

PROVING RELATIONS BETWEEN ANTILIZOMCINE ACTIVITY AND REPRODUCTIVE FUNCTION OF ENTEROCOCCUS UNDER CO-CULTVATING WITH THE SIMPLEST *BLASTOCYSTIS HOMINIS*

Bugero N.V.

Uliyanovsk state university, Uliyanovsk, Russia (432025, Uliyanovsk, 12-Lva Tolstogo st.), e-mail: nbugero@mail.ru

The work contains results of studying a persistent potential of enterococcus strains that have been discharged under a bowel disbiosis and data on relation between antilizomcine activity and reproductive function of enterococcus with their co-cultivating with the simplest *Blastocystis hominis*. The obtained results allow us to conclude that producing of antilizomcine factor by micro-organisms is a prerogative function of rather stationary than actively-parting bacterial cells. A dependence of a slower growth of enterococcus strains with high indications of the studied characteristic against low-active has been established. It proves an integration of antilizomcine characteristic with factors that define inhibition of bacterial population development and control bacterial biomass accumulation.

Key words: *Blastocystis hominis*, enterococcus, persistent potential, antilizomcine activity, reproductive function of enterococcus.

Введение

В последние годы появились работы, в которых приведены фактические данные о важной роли в формировании патобиоценозов кишечника, помимо бактерий и грибов, таких простейших как *Blastocystis hominis* [7–9].

Возбудитель бластоцистной инвазии является микроорганизмом, к усилению агрессии которого, с одной стороны, могут приводить факторы, снижающие защитные силы макроорганизма, а с другой стороны – микроорганизмы, входящие в состав биоценоза.

Литературные данные и результаты собственных исследований показали, что развитие бластоцистоза приводит к заселению кишечника условно-патогенными микроорганизмами.

При этом формируются новые микробные сообщества с новыми функциональными характеристиками. Выявлена возможность поддержания численности ряда бактерий при взаимодействии с простейшими [1; 2] и регуляции в результате внутриклеточного паразитирования некоторых их свойств, в частности устойчивости к фагоцитозу [2; 3], антилизоцимной активности [1; 2]. Однако сведения об усилении факторов персистенции бактерий в результате взаимодействия с простейшими носят отрывочный характер. Это обстоятельство определило актуальность изучения роли персистентных свойств и репродуктивной функции энтерококков в ассоциации с простейшими бластоцистами.

Материалы и методы

При анализе фекалий пациентов с дисбиотическими нарушениями в составе облигатной и факультативной микрофлоры использовали общепринятый бактериологический метод. Объектом для изучения послужили культуры *Enterococcus faecalis*, с различным уровнем антилизоцимной активности. Антилизоцимную активность бактерий энтерококков определяли по методу Бухарина О.В., 2002 [3]. Для получения культур простейших *B. hominis* использовали среду Surech. Выявление бластоцист в препаратах проводили микроскопическими и культуральными методами. Экспериментальное сокультивирование бактерий *E. faecalis* с простейшими *B. hominis* осуществляли *in vitro* на модифицированной среде Suresh (приоритетная справка № 2008115689 от 17.10.2009).

При описании развития бактериальных культур учитывали фазы роста, величину и время наступления максимального насыщения среды ($M_{\text{тах}}$, у.е. и $T_{\text{мин}}$, ч), высчитывали прирост биомассы за 1–5 ч. Кроме того, замеряли диаметр колоний (ДК, мм) при высеве взвеси микробов с 20-30 КОЕ на МПА с инкубацией 72 ч при 37 °С [4].

Статистическую обработку результатов исследований выполняли на персональном ЭВМ типа IBM «Pentium III», графическая обработка материалов выполнена с помощью пакета прикладных программ Excel-2007 [5].

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования была изучена микрофлора 254 обследуемых лиц с дисбиозом кишечника. Простейшие бластоцисты были обнаружены в 70% случаев. Интерпретация полученных результатов показала, что присутствие в микрофлоре кишечника простейших *B. hominis* в подавляющем большинстве наблюдений сопровождается нарушением микробиоценоза кишечника, что характеризуется уменьшением представителей

нормальной флоры (бифидобактерий, лактобактерий, бактероидов) и увеличением условно-патогенных микроорганизмов (энтерококков, клебсиелл, стафилококков).

Учитывая данные анализа по идентификации бактерий, обитающих в кишечнике, было замечено, что в подавляющем большинстве наличие бластоцистной инвазии сопровождается резким увеличением числа условно-патогенных бактерий вида *Enterococcus faecalis*. В связи с этим исследование межпопуляционных взаимоотношений между простейшими и бактериями было проведено на модели совместного культивирования, составляющими которого были бластоцисты и *E. faecalis*.

Анализ экспрессии антилизосимной активности (АЛА) у *E. faecalis* показал, что данный признак зарегистрирован у 100% (211) исследуемых культур, по своим абсолютным значениям варьирующим от 1,3 до 6,1 мкг/мл. В дальнейшем все штаммы *E. faecalis* были разделены на 3 группы в зависимости от степени выраженности данного свойства. 1-я группа включала штаммы с низким уровнем АЛА – до 2 мкг/мл включительно, 2-я со средним – 3–4 мкг/мл и 3-я с высоким уровнем – 5–6 мкг/мл и более. Доля штаммов с низкими значениями АЛА составила 45,5% (96 штаммов), со средними – 30,3% (64 штамма) и 24,2% (51 штамм) с высокими показателями АЛА.

Анализ роста культур *E. faecalis* после совместного культивирования выявил определенные различия в развитии их популяций в зависимости от исходного уровня их АЛА. Установлено, что культуры *E. faecalis* с относительно высоким уровнем АЛА (>5-6 мкг/мл) развивались несколько медленнее, чем штаммы с низкой АЛА (>2 мкг/мл), что проявлялось уменьшением прироста биомассы бактерий, особенно на начальных этапах культивирования ($p < 0,05$). В монокультуре, напротив, колонии энтерококков со средними и высокими показателями развивались существенно быстрее, чем с низкими значениями изучаемого признака.

Кроме того, культуры энтерококков после сокультивирования с простейшими имели достоверно ниже уровень максимального насыщения среды ($M_{\text{таx}}$) ($0,5 \pm 0,2$ против $0,7 - 0,8 \pm 0,1$ в контроле), $p < 0,05$, а также наблюдалась тенденция увеличения минимального времени удвоения биомассы ($t_{\text{m}i_n}$, мин), в контроле удвоение биомассы колоний энтерококков происходило в 2 раза медленнее, чем в эксперименте.

Анализ полученных данных позволил выявить максимальное насыщение среды у штаммов *E. faecalis* с высокой АЛА, которое было равно $83,79 \pm 0,01$ мин ($p < 0,02$), в то время как у культур *E. faecalis* с низкими значениями АЛА оно составило $18,81 \pm 0,02$ мин ($p < 0,01$).

Что касается удельной скорости роста бактериальных популяций *E. faecalis*, то ее повышение заметно отставало у штаммов с высокой АЛА по сравнению со штаммами, где

уровень АЛЖ имел средние (3–4 мкг/мл) и низкие (2 мкг/мл) показатели. В монокультуре наблюдалась обратная тенденция.

Далее нами был изучен диаметр колоний энтерококков до и после совместного культивирования. Установлено, что после совместного культивирования при росте на МПА у штаммов *E. faecflis* с низкой АЛЖ средний диаметр колоний был в 2 раза больше (5,7 против 2,9 мм) по сравнению с культурами, проявляющими высокие и средние значения персистентной характеристики.

Для уточнения структуры взаимосвязи уровня антилизозимной активности с параметрами популяционного роста был проведен корреляционный анализ полученных показателей по коэффициенту Спирмена. Его результаты дали основание предположить участие этого признака в обеспечении репродуктивного процесса у энтерококков. У штаммов *E. faecflis*, имеющих низкие показатели АЛЖ, из наиболее значимых корреляционных пар выделялись следующие взаимосвязи уровня АЛЖ: t_{max} ($r=0,56$) и диаметр колоний ($r=0,39$) – при низкой АЛЖ. Для *E. faecflis* с высокой выраженностью признака – t_{max} ($r= -0,48$) и диаметр колоний ($r= -0,31$).

Таким образом, наличие у *E. faecflis* высокого исходного уровня продукции АЛЖ при сокультивировании с бластоцистами приводило к достоверному уменьшению диаметра колоний и увеличению времени максимального насыщения среды. Для штаммов, имеющих низкие значения признака, это соотношение носило обратный характер.

Для решения вопроса о хронологической сопряженности между динамикой антилизозимного секрета и репродуктивной функцией у всех тестируемых культур была прослежена почасовая экспрессия признака.

Анализ результатов свидетельствует о том, что у культур *E. faecflis* с высокими значениями АЛЖ при совместном культивировании с бластоцистами экспрессия признака характеризовалась двумя подъемами. Первое нарастание антилизозимной активности было установлено в период интенсивного физиологического приспособления культур – в лаг-фазу (первые 4 часа культивирования), затем была зафиксирована вторая волна уровня активности в логарифмическую фазу, которая составляла 4–6 часов, и в стационарной фазе (8–24 часа) отмечали некоторое уменьшение признака. В монокультуре увеличение АЛЖ энтерококков носило более плавный характер и изменялось в течение 4–20 часов, затем наблюдалось некоторое уменьшение признака в стационарной фазе (20–24 часа), в дальнейшем изменений АЛЖ не происходило.

У штаммов с начальной низкой активностью появление АЛЖ ассоциировалось с фазой медленного роста (1–3 часа), а дальнейшая динамика характеризовалась резким подъемом в фазу логарифмического роста (4–5 часов) и выходом на плато (6–24 часа) в стационарную

фазу. В контроле у энтерококков с низкими показателями АЛА существенных различий не наблюдалось.

Таким образом, сопоставление кинетических кривых уровня АЛА и развития бактериальных культур свидетельствует как о сопряженности экспрессии антилизозимного признака с фазностью популяционного роста, так и об относительности влияния размера биомассы бактерий на уровень АЛА.

Заключение

Изучение взаимосвязи между репродуктивной функцией энтерококков и антилизозимной активностью до и после сокультивирования с простейшими бластоцистами показало наличие взаимосвязи между экспрессией признака и фазностью популяционного роста. Полученные результаты позволяют говорить, что продуцирование микроорганизмами антилизозимного фактора является скорее прерогативой стационарных, нежели активно делящихся бактериальных клеток. Установлена зависимость более медленного роста высокоактивных штаммов бактерий по сравнению с низкоактивными. Это свидетельствует об интеграции антилизозимного признака с факторами, определяющими ингибирование развития бактериальной популяции и контролирующими накопление биомассы бактерий.

Список литературы

1. Бугеро Н.В., Потатуркина-Нестерова Н.И. Факторы персистенции простейших фекальной флоры при дисбиозе кишечника // Вестник нов. мед. технологий. – 2010. – № 5. – С. 56-62.
2. Бухарин О.В. // Журн. микробиол. – 1994. – Приложение. – С. 4-13.
3. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Мальшкин А.П., Немцева Н.В. // Журн. микробиол. – 2004. – № 3. – С. 91-93.
4. Гинцбург А.Л., Зигангирова Н.А., Народицкий Б.С. Пищевые продукты и пищевые добавки. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов. Методические указания. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1998. – 178 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия (учебное пособие для биологических специальностей университетов). – М. : Высшая школа, 1990. – 215 с.
6. Пушкарева В.И., Величко В.В., Каминская А.А. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2005. – № 3. – С. 39.

7. Guignard S., Arienti H., Freyre L., Lujan H., Rubinstein H., Frasi M. Prevalence of enteroparasites in a residence for children in the Córdoba province, Argentina // *European Journal of Epidemiology*. – 2000. – V. 16. – P. 287-293.
8. Taamasri P., Leelayoova S. Prevalence of *Blastocystis hominis* carriage in Thai army personnel based in Chonburi, Thailand // *Mil. Med.* – 2002. – Aug. – V. 167 (8). – P. 643–646.
9. Yoshikawa H., Abe N., Iwasawa M., Kitano S., Nagano I., Wu Z., Takahashi Y. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – V. 38. – P. 1324–1330.

Рецензенты

Артемьева Е.А., д.биол.н., профессор кафедры зоологии Ульяновского государственного педагогического университета им. И.Н. Ульянова, г. Ульяновск.

Нестеров А.С., д.мед.н., профессор кафедры кожно-венерологических болезней Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск.