Научная статья
Original article
УДК 579.61

ВЗАИМОВЛИЯНИЕ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI И PSEUDOMONAS AERUGINOSA НА РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

INFLUENCE OF CO-CULTURED STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, PSEUDOMONAS AERUGINOSA ON GROWTH AND REPRODUCTION IN VITRO

Надеждина Екатерина Андреевна, Студент 3 курс, Педиатрический факультет, ФГБОУ ВО БГМУ, Россия, г. Уфа

Халилова Динара Минваевна, Студент 3 курс, Лечебный факультет, ФГБОУ ВО БГМУ, Россия, г. Уфа

Смагина Галина Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, ФГБОУ ВО БГМУ, Россия, г. Уфа

Громенко Дарья Дмитриевна, Студент 5 курс, Лечебный факультет, ФГБОУ ВО БГМУ, Россия, г. Уфа

Nadezhdina Ekaterina Andreevna, 3rd year student, Faculty of Pediatrics, BSMU, Russia, Ufa

Khalilova Dinara Minvaevna, 3rd year student, Faculty of Medicine, BSMU, Russia, Ufa

Smagina Galina Ivanovna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, BSMU, Russia, Ufa

Gromenko Daria Dmitrievna, 5th year student, Faculty of Medicine, BSMU, Russia, Ufa

Аннотация: В статье представлены результаты изучения взаимовлияния Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa на рост и размножение при совместном культивировании на мясо-пептонном агаре (МПА). В литературе неоднократно отмечено их взаимодействие in vivo по типу конкурентного [4], [5], [6], [7], [8]. Несмотря на это, проведенное при малом сроке (24ч.) совместного культивирования исследование in vitro разницы в количестве выросших колоний микроорганизмов в каждом образце не продемонстрировало, что свидетельствует об отсутствии проявления патогенности по отношению друг к другу в смеси. Выдвигается предположение, что антагонистический тип взаимодействия микробов in vitro будет выявлен лишь при увеличении срока культивирования, а также использования мясо-пептонного бульона (МПБ) в качестве исходной питательной среды.

Annotation: This article presents the results of studying the mutual influence of co-cultured Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa on growth and reproduction on meat-peptone agar (MPA). Their interaction in vivo as a competitive type has been noted in the literature [4], [5], [6], [7], [8]. In spite of this, in vitro study carried out for a short period (24 h) of co-culturing showed no difference in the number of grown microbial colonies in each sample, indicating the absence of pathogenicity to each other in the mixture. It is suggested that the antagonistic type of microbial interaction in vitro will be revealed only by increasing the period of cultivation as well as by using meat-peptone broth (MPB) as an initial nutrient medium.

Ключевые слова. Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, совместное культивирование, in vitro

Key words. Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, co-cultivation, in vitro

Актуальность. По данным ВОЗ, ежегодно в мире диагностируется порядка 20-30 миллионов случаев гнойно-септических инфекций [1].

Наиболее часто встречающимися в ране микроорганизмами признаны *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* [2]. Реализация и особенности течения инфекционного процесса, вызванного этими условно патогенными микробами, коррелируют с качественными и количественными характеристиками микробного пейзажа содержимого очага поражения и, соответственно, с тяжестью клинической картины [5]. Поэтому изучение взаимовлияния на модели in vitro является ключевым этапом для формирования представления о сочетанном влиянии микроорганизмов разных видов на рост и размножение каждого микроба в отдельности и ассоциации в целом, что является актуальной проблемой.

Цель работы

Изучить особенности взаимовлияния *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* на рост и размножение при совместном культивировании чистых культур на мясо-пептонном агаре.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе кафедры микробиологии, вирусологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава РФ. Объектом исследования являлось гнойное содержимое панариция большого пальца правой руки мужчины 45 лет. Исследование обсемененности материала микроорганизмами проводили бактериоскопическим и бактериологическим методами. Выделение чистых культур *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* (далее по тексту *St.aureus, Ps.aeruginosa, E.coli* соответственно) проводили по методу Дригальского [3]. В качестве ростовой среды использовали мясо-пептонный агар (МПА). Разработана схема опыта по совместному культивированию исследуемых микроорганизмов. Приготовление исходных взвесей *St.aureus, Ps.aeruginosa, E.coli* проводили следующим образом: в маркированные пробирки (1,2,3) внесли 2 мл. стерильного физиологического раствора и растворили в нем по 1 петле диаметром 2 мм. суточных культур микроорганизмов, выросших на МПА (St. *aureus, E.coli, Ps.aeruginosa соответственно)*. Смеси исходных взвесей культур готовили в пробирках в

различных комбинациях: в пробирку №1 внесли St.aureus и E.coli; в пробирку №2: St.aureus и Ps.aeruginosa; в пробирку №3: E.coli и Ps.aeruginosa; в 4-ую пробирку: St.aureus , E.coli и Ps.aeruginosa (по 30 мкл. каждый).

Для постановки опыта использовали 3 маркированные чашки Петри с МПА (1-3), разделенные на 4 сектора каждая. Затем в секторы внесли соответствующие взвеси в пробирках (1-4), расшпателевали «сплошным газоном». Далее посевы инкубировали при температуре 37^0С в течение 18-24 часов в термостате. Морфологию колоний изучали после 24-часового инкубирования при тех же условиях, проводили подсчет и идентификацию с помощью полуавтоматического счетчика.

Результаты и обсуждение.

При микроскопировании мазков (n=3), приготовленных из нативного исследуемого материала, обнаружен консорциум микроорганизмов (рис.1)

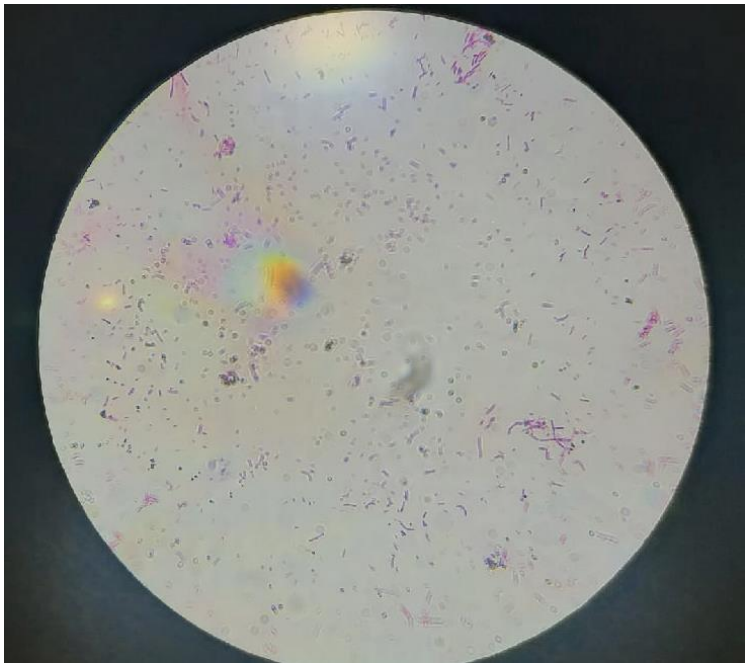


Рисунок 1. *Микроскопия мазка, полученного из исследуемого материала больного*

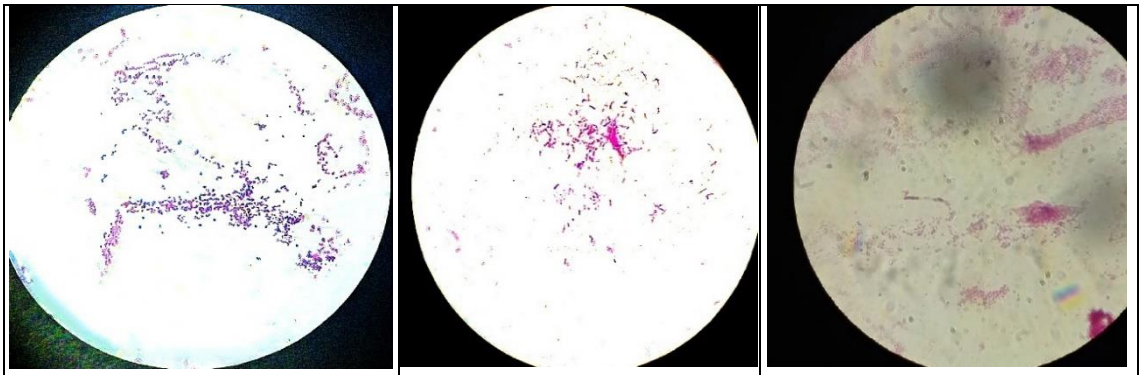
На рисунке 1 показано наличие в гное нескольких видов микроорганизмов: Гр «+»-кокков, Гр «-» палочек.

В посевах гноя также обнаружены 5 видов колоний микроорганизмов (табл.1)

Таблица 1. Качественная и количественная характеристика выросших на МПА колоний микроорганизмов

№	Морфология колоний	Наименование микроорганизма	Количество на чашке (n=3)
1	Колонии круглые, выпуклые, по типу «виноградной грозди», желтого цвета с «радужным» ореолом вокруг, гладкой поверхностью и ровными краями	St.aureus	3
2	Колонии имеют шероховатую поверхность, плоские, с подрытыми неровными краями	E.coli (R-форма)	25 >
3	Колонии по форме круглые, выпуклые, влажные, с гладкой поверхностью и ровными краями	E.coli (S-форма)	40 >
4	Колонии плоские, с гладкой поверхностью и ровными краями	Ps.aeruginosa	40 >>
5	Колонии по форме круглые, выпуклые, влажные, с гладкой поверхностью и ровными краями	Неидентифицированные колонии	30 <

По методу Дригальского выделили чистые культуры Staphylococcus aureus, Escherichia coli и Pseudomonas aeruginosa. (см. рис.2)



Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa

Рисунок №2. *Микроскопия мазков, полученных из посевов по методу Дригальского*

На рисунке №2 показаны окрашенные по Граму мазки чистых культур Staphylococcus aureus, Escherichia coli и Pseudomonas aeruginosa.

Затем приготовили взвеси исходных культур (таб.2)

Таблица №2. Подсчет выросших колоний микроорганизмов

№	Чашка №1		Чашка№2		Чашка №3	
	Состав смеси	Кол-во выросших колоний	Состав смеси	Кол-во выросших колоний	Состав смеси	Кол-во выросших колоний
1	St.aureus	98	E.coli	105	Ps.aeruginosa	124
2	St.aureus+ E.coli	212	St.aureus+ E.coli	200	Ps.aeruginosa+ E.coli	222
3	St.aureus+ Ps.aeruginosa	195	E.coli+Ps.aeruginosa	204	Ps.aeruginosa+ St.aureus	202
4	St.aureus+ Ps.aeruginosa+ E.coli	307	St.aureus+ Ps.aeruginosa+ E.coli	303	St.aureus+ Ps.aeruginosa+ E.coli	315

В таблице №2 показано, что через 24 часа инкубирования разницы в количестве выросших колоний микроорганизмов в каждом образце не обнаружено: в строке №1 количество микроорганизмов в среднем составило 109, в строке №2 - 211, в строке №3 - 200, в строке №4 – 308 КОЕ/чашку соответственно. Достоверность полученных результатов (*p)* меньше чем 0,05, поэтому разница в росте колоний всех трех тестируемых видов микроорганизмов недостоверна. Следовательно, через 24 часа культивирования как чистых культур, так и их смесей, существенного влияния на размножение каждой культуры в отдельности и в смесях in vitro (1-4) не оказывают.

Заключение.

1. В гнойном содержимом панариция пальца обнаружен консорциум микроорганизмов, состоящий из не менее видов.
2. Микроскопическим методом выявлено максимальное количество микробных клеток в поле зрения микроскопа Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.
3. При совместном культивировании на плотной питательной среде при равном количестве Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa исходных взвесей микроорганизмов (109 КОЕ/чашка) существенного влияния на рост и размножение не оказывают ($p<0.05$).
4. Возможно, данные микроорганизмы не проявляют своих патогенных свойств по отношению друг к другу в смеси в связи с малым сроком совместного культивирования.
5. Считаем необходимым увеличить срок совместного культивирования до 10-12 дней, а в качестве исходной питательной среды использовать МПБ.

Список литературы.

1. Patel G.P. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock. / Patel G.P., Gurka D.P., Balk R .A. // Curr.Opinin. Crit. Care. 2003, Vol.9 (5). P. 390-396.

2. Микрофлора при хирургической инфекции мягких тканей и инфицированных ранах /В. В. Берещенко [и др]. 2006.
3. Микробиологические методы: учеб.пособие / Г. К. Давлетшина [и др] // Изд-во ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2018. – 119 с.
4. Brandenburg K. S. The impact of simultaneous inoculation of Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Candida albicans on rodent burn wounds. / Brandenburg K. S., Weaver A. J., Karna S. L. R., & Leung K. P. // Burns. 2021, Vol. 47, P.1818-1832.
5. An Hotterbeekx. In vivo and In vitro Interactions between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus spp / An Hotterbeekx, Samir Kumar-Singh, Herman Goossens, and Surbhi Malhotra-Kumar". // Front Cell Infect Microbiol. 2017, Vol.7, P.106.
6. Роль микробных ассоциаций в инфекционной патологии человека / Козлов Л.Б. // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9 (часть 3) – С. 366-370
7. Biswas L. Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. / Biswas L., Biswas R., Schlag M., Bertram R., Gotz F // Appl. Environ. Microbiol. 2009, Vol.75, P.6910–6912.
8. Antonic V. *Pseudomonas aeruginosa* induces pigment production and enhances virulence in a white phenotypic variant of *Staphylococcus aureus*. / Antonic V., Stojadinovic A., Zhang B., Izadjoo M. J., Alavi M. // Infect. Drug Resist. 2013, Vol.6, P.175–186.

Literature

1. Patel G.P. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock. / Patel G.P., Gurka D.P., Balk R .A. // Curr.Opinin. Crit. Care. 2003, Vol.9 (5). P. 390-396.
2. Microflora in surgical soft tissue infection and infected wounds / V. V. Bereshchenko [et al]. 2006.

3. Microbiological methods: textbook / G.K. Davletshina [et al] // Publishing house of FGBOU VO BSMU of the Ministry of Health of Russia, 2018. - 119 c.
4. Brandenburg K. S. The impact of simultaneous inoculation of Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Candida albicans on rodent burn wounds. / Brandenburg K. S., Weaver A. J., Karna S. L. R., & Leung K. P. // Burns. 2021, Vol. 47, P.1818-1832.
5. An Hotterbeekx. In vivo and In vitro Interactions between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus spp / An Hotterbeekx, Samir Kumar-Singh, Herman Goossens, and Surbhi Malhotra-Kumar'. // Front Cell Infect Microbiol. 2017, Vol.7, P.106.
6. Роль микробных ассоциаций в инфекционной патологии человека / Козлов Л.Б. // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9 (часть 3) – С. 366-370
7. Biswas L. Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. / Biswas L., Biswas R., Schlag M., Bertram R., Gotz F // Appl. Environ. Microbiol. 2009, Vol.75, P.6910–6912.
8. Antonic V. *Pseudomonas aeruginosa* induces pigment production and enhances virulence in a white phenotypic variant of *Staphylococcus aureus*. / Antonic V., Stojadinovic A., Zhang B., Izadjoo M. J., Alavi M. // Infect. Drug Resist. 2013, Vol.6, P.175–186.

© Надеждина Е.А., Халилова Д.М., Смагина Г.И., Громенко Д.Д. 2022 Научно-образовательный журнал для студентов и преподавателей «StudNet» №4/2022.

Для цитирования: Надеждина Е.А., Халилова Д.М., Смагина Г.И., Громенко Д.Д. ВЗАИМОВЛИЯНИЕ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI И PSEUDOMONAS AERUGINOSA НА РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO// Научно-образовательный журнал для студентов и преподавателей «StudNet» №4/2022.