

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ К
АНТИБИОТИКУ ПИОЦИАНИНУ**Е.А. Хан

Научный руководитель: доцент, к.м.н. М.В. Чубик

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, 634050, г. Томск, проспект Ленина, дом 30, 634050

E-mail: elenal@tpu.ru**DETERMINATION ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF SPORE-FORMING BACTERIA TO
PYOCYANIN**E. A. Khan

Scientific Supervisor: Associate Professor, Candidate of Medical Sciences M. V. Chubik

National Research Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: elenal@tpu.ru

Abstract. Isolation of new antibiotics from substances that weren't previously used as antimicrobial drugs may be effective against resistant bacteria. *Pseudomonas aeruginosa* is a producer one of these substances. Pyocyanin is the blue-green pigment of the phenazine series and the secondary metabolite. In the present study, a five-day cultivation of *P. aeruginosa*, extraction and analysis of pyocyanine was carried out. Confirmation of the pyocyanin was done through UV-visible spectrophotometric analysis. In UV-Vis spectrophotometric analysis, a maximum absorption was observed at 690nm. Pyocyanin was used to determine the minimum inhibitory concentration against spore-forming bacteria *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. The serial dilution method showed that for *Bacillus cereus* the minimum inhibitory concentration of pyocyanin is 29 µg/ml, and for *Bacillus subtilis* 17,8 µg/ml. It was detected, that pyocyanin can suppress the growth of spore-forming bacteria.

Введение. В настоящее время резистентность микроорганизмов к существующим антимикробным агентам увеличивается, поэтому возникает необходимость в получении новых антибиотиков. Пиоцианин может использоваться в качестве терапевтического средства для лечения инфекционных заболеваний, вызванных различными бактериями. Целью исследования ставится определение минимальной подавляющей концентрации пиоцианина для спорообразующих бактерий на примере бактерий рода *Bacillus*.

Bacillus subtilis — это грамположительные спорообразующие аэробные бактерии, имеет вид прямой палочки без цвета, размер примерно составляет 0,7 мкм в толщину и 2—8 мкм в длину. *B. subtilis* обнаруживается в почве и желудочно-кишечном тракте жвачных животных и человека. Сенная палочка способна вызвать острый гастроэнтерит. *B. cereus* является одним из наиболее распространенных загрязняющих веществ на фармацевтических производствах [1, 2].

Pseudomonas aeruginosa является грамотрицательной палочковидной бактерией, которая может секретировать небольшие органические молекулы, экзоферменты, ферменты, разрушающие ткани, токсины и другие субстраты, которые нарушают физиологические функции человека. Пиоцианин – синезеленый пигмент, один из представителей антибиотиков феназинового ряда, которые выделяют бактерии

Ps. aeruginosa. Вторичный метаболит губительно влияет на эукариотические и прокариотические клетки, а также обладает высокой бактерицидной активностью. Ингибирование жизнедеятельности микроорганизмов пиоцианином является результатом его уникального окислительно-восстановительного действия. Во время дыхания пиоцианин способен преобразовывать кислород в супероксидный радикал, поэтому устойчивость бактерии к пиоцианину будет определяться уровнем супероксиддисмутазы и каталазы, которыми обладает организм, а также наличием кислорода. *Ps. aeruginosa* способна сопротивляться пиоцианину из-за ограниченного окислительно-восстановительного цикла этого соединения и в условиях, благоприятствующих выработке пиоцианина, активность каталазы и супероксиддисмутазы возрастает [3].

Экспериментальная часть. На первом этапе эксперимента была получена суточная культура продуцента антибиотика *Ps. aeruginosa* на ГРМ-агаре №9. Для выделения пиоцианина культивирование проводили в течение 5 дней в ГРМ-бульоне в термостате при 37°C.

На следующем этапе пигмент экстрагировали из культуральной жидкости с помощью хлороформа в соотношении 2:1. Полученный раствор очистили и проанализировали с помощью тонкослойной хроматографии, высокоэффективной хроматографии и спектрофотометра. Концентрация пиоцианина была определена по формуле Бугера-Ламберта-Бера (1) при длине волны 690 нм:

$$C = M \times \frac{D}{\varepsilon \times l} \quad (1)$$

где С – концентрация вещества в растворе, мг/мл;

D – оптическая плотность поглощающего вещества;

M – молярная масса, (210 г/моль);

ε – молярный коэффициент поглощения (для пиоцианина $\varepsilon=3400$ моль⁻¹ · л · см⁻¹);

l – длина оптического пути.

Для достижения поставленной цели определяли чувствительность *Bacillus subtilis* и *B. cereus* к пиоцианину с определением показателя минимальной подавляющей концентрации антибиотика (МПК). Чувствительность бактерий к пиоцианину определялась методом серийных разведений в мясо-пептонном бульоне. Концентрация раствора антибиотика рассчитывалась исходя из максимальной концентрации в серии разведений, а также с учетом разбавления пиоцианина при последующей инокуляции. По данным литературы, минимальной подавляющей концентрацией антибиотика для *Bacillus subtilis* является 17,8 мкг/мл, для *Bacillus cereus* 14,5 мкг/мл [4]. Для приготовления инокулюма получали суточную микробную взвесь в физиологическом растворе, эквивалентную 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Концентрация микроорганизмов составила примерно 10⁶ КОЕ/мл.

Далее добавили в каждую пробирку по 1 мл инокулюма, а также в пробирку с бульоном без пиоцианина для контроля культуры. Инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 24 часов. Пробирка с «отрицательным» контролем хранилась в холодильнике при +3 °С.

Эксперименты по определению минимальной подавляющей концентрации пиоцианина по отношению к бациллам повторяли шесть раз. Вычисляли среднее значение. Для сравнения полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты. Рост микроорганизмов в пробирках контролировали визуально. После этого был произведен пересев культур из пробирок на чашки Петри с ГРМ-агаром №4, для определения количества колоний. Культивировали чашки Петри с посевами в течение 24 часов при температуре 37°C, после этого учитывали результаты. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) пиоцианина, мкг/мл

МПК, мкг/мл	Опытные микроорганизмы	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	17,8 ± 1,6	29 ± 1,5

Значение t-критерия Стьюдента 5,11. Различия являются статистически значимыми (p = 0,0006), число степеней свободы f = 10. Критическое значение t-критерия Стьюдента = 2,2, при уровне значимости α = 0,05.

В ходе эксперимента была определена МПК антибиотика пиоцианина для *Bacillus subtilis*. При конечной концентрации антибиотика 71,2 мкг/мл, 35,6 мкг/мл и 17,8 мкг/мл рост бактерий на чашке Петри не наблюдался, а пробирки с бульоном, пиоцианином и инокулюмом оставались прозрачными. При конечной концентрации антибиотика 8,9 мкг/мл отмечали слабый рост культуры и более интенсивный рост при концентрации пиоцианина 4,45 мкг/мл. Следовательно, минимальной подавляющей концентрацией является 17,8 мкг/мл.

При конечной концентрации пиоцианина 116 мкг/мл, 58 мкг/мл и 29 мкг/мл рост *Bacillus cereus* отсутствовал. При концентрации антибиотика 14,5 мкг/мл на плотной среде образовались характерные колонии. При сравнении показателя МПК пиоцианина по отношению к разным представителям рода бацилл, установили, что для губительного эффекта по отношению к *Bacillus subtilis* достаточно 17,8 ± 1,6 мкг/мл пиоцианина. Для подобного эффекта по отношению к *Bacillus cereus* необходимо 29 ± 1,5 мкг/мл пиоцианина.

Заключение. Данное исследование показывает возможность использования пиоцианина, выделенного от *Pseudomonas aeruginosa*, как антибиотика, который может подавлять рост спорообразующих бактерий. Для ингибирования роста бактерий на модели рода *Bacillus* установлено, что необходима небольшая концентрация антибиотика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borriss R., Danchin A., Harwood C. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement // *Microbial Biotechnology*. – 2018. – Vol. 1, №4. – P. 3–17.
2. Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98 с.
3. Hassan H.M., Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine // *J Bacteriol*. – 1980. – Vol. 141, №1. – P. 156–163.
4. Baron S.S., Terranova G., Rowe J.J. Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin // *Current microbiology*. – 1989. – Vol. 18, Issue 4. – P. 223–230.