

УДК 579.22

Н. В. Кур'ята, мол. наук. співроб., **Н. О. Єлинська**, канд. біол. наук, доц.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ЛІЗОЦИМНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ

Досліджували лізоцимну активність колекційних та вилучених з травного тракту здорових дітей штамів лактобацил. Встановлено наявність лізоцимної активності у одного колекційного та 17 отриманих штамів. Із усіх виділених штамів 16 мали низьку та один – середню лізоцимну активність. **Ключові слова:** лактобацили, лізоцим.

Оскільки нормальна кишкова мікробіота сприяє підтриманню біохімічного гомеостазу травного тракту, дуже важливим є встановлення тих чинників, які вона використовує для захисту макроорганізму. Одним з таких чинників є фермент лізоцим, який виділяють бактерії травного тракту різних тварин і людини. Однак більшість наявних даних присвячено лізоцимній активності патогенних бактерій, а лізоцимна активність представників нормальної мікробіоти травного тракту є недостатньо вивченою [1].

Здатність до продукції та виділення лізоциму описано не тільки у кишкової палички та стафілококів, а й у біфідобактерій, лактобацил і ентерококів. Як гідролітичний фермент він відіграє важливу роль у процесах росту і розмноження бактеріальних клітин. У лактобацил продукція лізоциму може бути пов'язана з їх високою антимікробною активністю. А. А. Ленцнером і співавторами [2] було досліджено лізоцимну активність як колекційних, так і ізольованих ними штамів лактобацил. Було знайдено лізоцимну активність у колекційних штамів *Lactobacillus fermentum* ATCC 8291 і *L. fermentum* ATCC 9338, а також у *L. brevis* ATCC 14869.

Метою даної роботи було дослідження лізоцимної активності штамів бактерій роду *Lactobacillus*, вилучених з травного тракту здорових дітей і отриманих з колекції ATCC.

Матеріал та методи дослідження

Матеріалом дослідження були 66 штамів лактобацил, виділених з фекалій здорових дітей віком від 1 до 7 років, та 4 колекційні штами *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. buchneri* ATCC 4005, *L. fermentum* ATCC 14931 і *L. acidophilus* ATCC 33200.

Лізоцимну активність штамів лактобацил оцінювали якісним і кількісним фотометричними методами за ступенем лізису клітинної

стілки тест-штаму *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т. Чисту культуру *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т вирощували на м'ясо-пептонному бульйоні при 37 °С протягом 48 годин, центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хвилин. Супернатант зливали, до осаду клітин приливали 0,5 % розчин NaCl [3]. Отриману суспензію центрифугували та двічі відмивали 0,07 М фосфатним буфером з рН 7,2—7,4, після чого її екстинкцію доводили до 0,300 одиниць на спектрофотометрі СФ-26 при $\lambda = 540$ нм [4]. Суспензію клітин тест-мікроба автоклаували при 120 °С протягом 20 хвилин і зберігали при 4 °С.

Якісний тест на наявність лізоцимної активності провадили за методом [5] у нашій модифікації. Досліджувані штами лактобацил вирощували у рідкому живильному середовищі MRS (5 мл) при 37 °С протягом 24 годин і центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хвилин. У дослідні проби вносили по 2 мл супернатантів досліджуваних культур і стандартної суспензії клітин *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т. Вимірювали екстинкцію суспензії клітин тест-мікроба в супернатантах досліджуваних культур лактобацил при $\lambda = 540$ нм, отримані результати служили контролем (E_0). В оригінальній методиці контролем слугувала суспензія клітин тест-мікроба в стерильному рідкому живильному середовищі. Дана модифікація методики була зумовлена тим, що в процесі росту різні штами лактобацил по-різному використовують поживні речовини, які містяться в MRS-бульйоні, а отже екстинкція супернатанту кожного досліджуваного штаму має відрізнятися від екстинкції стерильного бульйону. Пробірки інкубували при 37 °С протягом 4 годин [4], після чого знову вимірювали екстинкцію при $\lambda = 540$ нм, отримуючи таким чином дослідний показник (E_t). Штам вважали лізоцимпозитивним, якщо у якісному тесті на лізоцимну активність дослідне значення екстинкції супернатанту досліджуваного штаму лактобацил та клітинних стінок тест-мікроба було нижчим від контрольного на 10 %, тобто якщо виконувалася умова $1 - E_t / E_0 \geq E_0 / 10$, де E_0 — контрольне значення екстинкції, E_t — дослідне значення.

Кількісний дослід ставили аналогічним чином, однак, окрім вимірів екстинкції суспензії клітинних стінок тест-мікроба в супернатантах досліджуваних культур лактобацил, здійснювали фотометрію тричі відмитих фосфатним буфером клітин лактобацил, концентрацію яких було доведено тим же буфером до початкової. Для кожного штаму дослід провадили у 3 повторностях. Лізоцимну активність супернатантів досліджуваних штамів лактобацил обчислювали за формулою $ЛА = (E_0 - E_t) / E_s \cdot C$, де ЛА — лізоцимна активність супернатантів досліджуваних культур, мкг лізоциму/мл супернатанту · од. екстинкції суспензії лактобацил; E_0 — екстинкція проби до інкубації; E_t — екстинкція проби після інкубації; E_s — екстинкція суспензії відмитих лактобацил в ростовій концентрації; C — середній коефіцієнт, який відображує зміну екстинкції проб залежно від концентрації лізоциму. Коефіцієнт C знаходили за допомогою калібрувальної кривої (рис. 1), що відображувала ступінь лізису клітинних стінок *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т залежно від концентрації стандартного препарату лізоциму (кристалічного ліофілізованого з яєчного білка марки А) і виражали в мкг/мл.

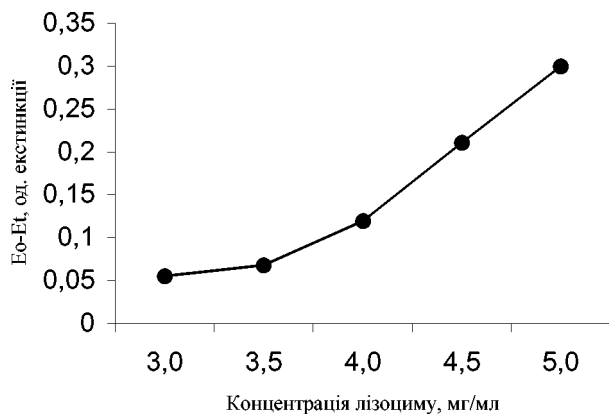


Рис. 1. Крива залежності ступеня лізису клітинних стінок *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т від концентрації стандартного препарату лізоциму

Лізоцимну активність вважали низькою, якщо її рівень був еквівалентний концентрації яєчного лізоциму і знаходився в межах від 0,1 до 5,0 мкг/мл, середнім — за значень від 5,01 до 15,0 мкг/мл, високим — за значень, більших за 15,1 мкг/мл [5].

Статистичне опрацювання результатів провадили з урахуванням t-критерію Стьюдента, $p < 0,05$ [6].

Результати дослідження

За допомогою якісного тесту було виявлено, що більшість штамів (75,8 %) лізоцимоподібної активності не виявили, що дає підстави вважати їх лізоцимнегативними. 17 вилучених штамів лактобацил (25,7 %) були здатними до лізису клітинної стінки тест-штаму *Micrococcus luteus* УКМ Ас 645^Т, тобто виявилися лізоцимпозитивними. За оцінки кількісного тесту виявили, що серед лізоцимпозитивних штамів один штам мав середню лізоцимну активність, 16 штамів — низьку (рис. 2).

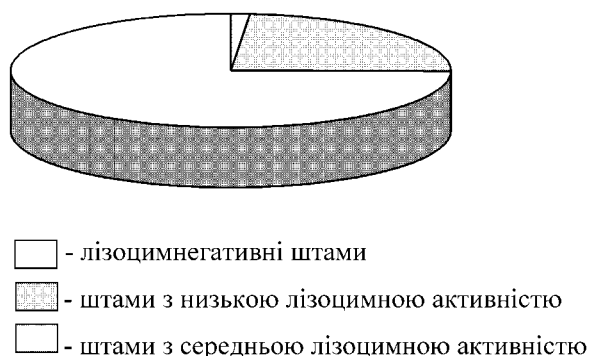


Рис. 2. Лізоцимна активність штамів лактобацил, вилучених з кишечника здорових дітей

Штамів з високою лізоцимною активністю знайдено не було. З колекційних штамів лізоцимну активність було знайдено тільки у *L. buchneri* ATCC 4005, і вона була низькою.

Дані про лізоцимну активність штамів лактобацил наведено в таблиці 1. Як видно з неї, рівень лізоцимної активності тих штамів, у яких вона була низькою, був еквівалентний концентраціям яєчного лізоциму від $0,15 \pm 0,04$ до $3,81 \pm 0,11$ мкг/мл; для штаму *Lactobacillus sp.* 291 з середнім рівнем лізоцимної активності цей показник був значно вищим.

Таблиця 1

Рівень лізоцимної активності штамів лактобацил

Ступінь лізоцимної активності	Штам	Лізоцимна активність (еквівалент концентрації яєчного лізоциму, мкг/мл)
Низький	<i>Lactobacillus sp.</i> 215	$0,15 \pm 0,04$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 206	$0,16 \pm 0,07$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 189	$0,18 \pm 0,01$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 202	$0,25 \pm 0,08$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 169	$0,26 \pm 0,08$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 183	$0,43 \pm 0,11$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 232	$0,53 \pm 0,16$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 222	$0,71 \pm 0,35$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 193	$0,73 \pm 0,16$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 16	$0,76 \pm 0,08$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 25	$0,80 \pm 0,16$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 269	$0,96 \pm 0,14$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 13	$1,02 \pm 0,08$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 22	$1,20 \pm 0,14$
	<i>L. buchneri</i> ATCC 4005	$1,63 \pm 0,01$
Середній	<i>Lactobacillus sp.</i> 432	$2,85 \pm 0,08$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 123	$3,81 \pm 0,11$
	<i>Lactobacillus sp.</i> 291	$6,38 \pm 0,08$

На підставі отриманих результатів було виявлено штами, у яких лізоцимна активність, вища за 1 мкг лізоциму/мл супернатанту · од. екстинкції суспензії лактобацил, поєднувалася з середньою або високою здатністю до цитоадгезії. Це були штами *Lactobacillus sp.* 13,

Lactobacillus sp. 22, *Lactobacillus sp.* 432, *Lactobacillus sp.* 123 і *Lactobacillus sp.* 291, а також *L. buchneri* ATCC 4005.

Нами вперше показано наявність лізоцимної активності у штамів *L. buchneri* ATCC 4005, тоді як, за даними Ленцнера, усі досліджувані ним штами *L. buchneri* були лізоцимнегативними. Штам *L. fermentum* ATCC 14931 не виявив лізоцимної активності, хоча, за даними літератури, 89 % штамів цього виду були лізоцимпозитивними [1].

Висновки

1. Із 66 штамів лактобацил, вилучених нами з кишечника дітей, лізоцимпозитивними виявилися 17 штамів, а з колекційних — 1 штам. Серед лізоцимпозитивних штамів були штами з низьким і середнім рівнем лізоцимної активності.

2. Штами *Lactobacillus sp.* 13, *Lactobacillus sp.* 22, *Lactobacillus sp.* 432, *Lactobacillus sp.* 123, *Lactobacillus sp.* 291 і *L. buchneri* ATCC 4005 можуть бути рекомендовані як основа пробіотичних препаратів для корекції мікробіоценозу шлунку та підтримання місцевого неспецифічного імунітету.

Роботу виконано в рамках проекту, підтриманого грантом Президента України для обдарованої молоді.

Література

1. Бухарин О. В., Вальшев А. В. Факторы персистенции кишечной микрофлоры при дисбиозе // Вестник РАМН. — 1997. — № 3. — С. 75—81.
2. Ленцнер А. А., Ленцнер Х. П., Тоом М. А. О способности лактобацилл микрофлоры человека продуцировать лизоцим // Журн. микробиол. — 1975. — № 8. — С. 77—81.
3. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. — Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1974. — 212 с.
4. Бухарин О. В., Вальшев А. В., Елагина Н. Н., Иванов Ю. Б., Черкасов С. В. Фотометрическое определение антилизоцимной активности микроорганизмов // Журн. микробиол. — 1997. — № 4. — С. 117—120.
5. Hawiger J. Frequency of staphylococcal lysozyme production tested by plate method // J. Clin. Path. — 1968. — V. 21. — № 3. — P. 390—393.
6. Плохинский Н. А. Математические методы в биологии. — М.: Изд-во МГУ, 1978. — 265 с.

Н. В. Курьята, Н. А. Елинская

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Резюме

Исследовали лизоцимную активность выделенных из пищеварительного тракта детей и коллекционных штаммов лактобацилл. Установлено наличие лизоцим-

ной активности у одного коллекционного и 17 выделенных штаммов. Среди всех 66 выделенных штаммов 16 (24,2 %) обладали низкой лизоцимной активностью, а один (1,5 %) обладал средним уровнем этой активности.

Ключевые слова: лактобациллы, лизоцим.

N. V. Kuryata, N. O. Yelinska

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

THE ABILITY OF LACTOBACILLI STRAINS TO LYSOZYME PRODUCITON

Summary

The ability of collection lactobacilli strains and strains, isolated from intestinal tract to produce lysozyme was investigated. The lysozyme production has been shown in one collection and 17 isolated strains. Among all 66 isolated strains, 16 strains (24,2 %) had low lysozyme activity, and one strain (1,5 %) had a moderate level of this activity.

Key words: lactobacilli, lysozyme.