

УДК 576.851.47.078.39

ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕЦИТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *PROTEUS*

Юрченко Л.А.

ДУ „Інститут мікробіології та імунології ім.
І.І.Мечникова АМНУ”, м. Харків

У патогенезі гнійно – запальних процесів все більше значення надається позаклітинним ферментним системам бактерій, які або пригнічують захисні фактори макроорганізму, або збільшують агресивність мікроорганізму. До таких ферментів належать фосфоліпази.

Фосфоліпази – це ферменти, що каталізують гідролітичне розщеплення фосфоліпідів, фосфоліпаза А діє на лецитин та зветься лецитиназою. Розрізняють чотири види лецитиназ: А, В, С і D. Серед патогенних мікроорганізмів розповсюджені лецитинази С, які виявляють типові ознаки бактеріальних токсинів, мають гемолітичні та антигенні властивості. Розчиняючи лецитин оболонки та мембран на гліцерол, жирні кислоти, фосфорну кислоту та холін, цей фермент відіграє роль одного з ведучих факторів патогенності мікроорганізмів [1].

Відносно повно та всебічно вивчена роль лецитинази у грам позитивних мікроорганізмів (збудників газової анаеробної гангрені, стафілококків, коринібактерій та ін.) [2, 3, 4, 5]. Але значення цього ферменту для грам негативних бактерій, зокрема для мікроорганізмів роду *Proteus*, висвітлена у науковій літературі недостатньо. Метою дослідження було вивчити особливості патогенезу протейних гнійно – запальних інфекцій та роль у ньому лецитинази збудника.

Матеріали та методи

Диференційною ознакою протей є їхня здатність до роїння (Н- форма). Роїння здійснюється за рахунок утворення клітин-швермерів довжиною 20-30 мкм через 3-4 години росту на МПА. Клітинна стінка швермерів утворює єдину оболонку без перетинок, по всій їх довжині рівномірно розташовані одинарні або парні ядерні структури. Через 0.5-1 годину швермери починають перетворюватись в звичайні клітини, серед яких знову утворюються подовжені форми роїння.

При деяких умовах (збільшенні концентрації поживних речовин, культивуванні при $t=45^{\circ}\text{C}$, додавання до середовища поверхово-активних речовин) протей може переходити з Н-форми до О-форми. При цьому він не здатен до роїння та утворює на поверхні агару ізольовані колонії з рівним краєм [6].

Відоме на теперішній час тверде поживне середовище для визначення лецитиназної активності мікроорганізмів, жовтково – сольовий агар, не використовується для протей, тому що являється селективним середовищем, що пригнічує їх ріст. Отже, на першому етапі необхідно було створити умови для

одночасного виявлення лецитиназної активності та пригнічення роїння протей.

Враховуючи феномен роїння, для його пригнічення було проведено випробування на двох твердих поживних середовищах; також для порівняння лецитиназної активності протей у О- та Н - формах скористалися методом, основаним на просвітленні жовткової суміші у пробірках під дією фосфоліпази центрифугатів бульйонних культур мікроорганізмів:

1. на поживному середовищі із солянокислого гідролізату еритроцитарної маси, розробленому в лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ ДУ « ІМІ ім. Мечникова » АМН України, патент № 23150 (UA) МПК (2006): C12N 1/20, до якого додали 20% жовткової суміші (1 жовток на 150 мл фізіологічного розчину) [7];

2. на експериментальному середовищі, яке має такий склад: глюкоза - 4%; пептон ферментативний - 7%; агар мікробіологічний - 3.5%; NaCl - 2.5%; жовткова суміш - 20% (рН 7.2). Основу автоклавають 20 хв при 1 атм. Після досягнення нею $t=45^{\circ}\text{C}$, до неї додають 20% жовткової суміші (1 жовток на 150 мл фізіологічного розчину) та розливають в стерильні чашки Петрі по 20 мл. Високі концентрації агару, пептону та цукру сприяють накопиченню поживних речовин в середовищі, що знижує феномен роїння.

Перед посівом добре підсушували чашки у термостаті. Залік результатів проводили впродовж 4 – х діб щоденно. Також для контролю на кожну чашку засівали бляшку культури *S.aureus* ATCC 25923.

3. для постановки дослідження, основаного на просвітленні жовткової суміші, готову суміш розводили фізіологічним розчином до отримання оптичної щільності, рівної 1.6 на ФЕК (фільтр №6, кювета 3 мм). У пробірки розлили по 5 мл розведеної жовткової суміші та додали по 1 мл центрифуга та 5 – добової бульйонної культури, що отримали на центрифугі при 5 тис. обертів на хвилину впродовж 20 хвилин. Штатив із пробірками поміщують у термостат при 37°C . Мірою активності вважають час до моменту появи повного просвітлення опитного розчину [8].

Штами вважаються неактивними, якщо просвітлення не настало впродовж однієї години, мало активним – якщо просвітлення спостерігається від 20 до 40 хвилин, активним – до 20 хвилин та високоактивним – при просвітленні суміші менше ніж за 5 хвилин.

Результати та обговорення

Для дослідження лецитиназної активності протей на твердих поживних середовищах використовували 18 – годинну культуру мікроорганізмів. Готували суспензію у стерильному фізіологічному розчині, що відповідала 1.0 одиниці каламутності за McFarland, з яких робили послідовні розведення до 10^{-6} – 10^{-7} мікробних клітин, засівали по 0.1 мл на запропоноване середовище. В роботу брали *Proteus vulgaris* ATCC 4636, який рекомендований для перевірки контролю якості поживних середовищ, та клінічні штами (8 штамів *Proteus vulgaris* та 12 штамів

Proteus mirabilis), які були виділені від хворих на запальні процеси.

Лецитіназну активність на запропонованому щільному середовищі виявили 5 клінічних штамів *P.vulgaris* та 10 штамів *P.mirabilis* (23. 81% та 47.62%

відповідно, всього 71.43%). На поживному середовищі із солянокислого гідролізату еритроцитарної маси лецитіназну активність виявили лише 4 (19.05%) штами *P.mirabilis*, які співпали на обох поживних середовищах. Отримані дані надані у таблиці 1.

Таблиця 1- Порівняна характеристика прояву лецитіназної активності на твердих поживних середовищах

Вид мікроорганізму	№ штаму	Лецитіназна активність мікроорганізмів	
		розроблене середовище	середовище із солянокислого гідролізату еритроцитарної маси
<i>P. vulgaris</i>	ATCC 4636	—	—
<i>P. vulgaris</i>	19	+	—
<i>P. vulgaris</i>	21	+	—
<i>P. vulgaris</i>	27	+	—
<i>P. vulgaris</i>	43	—	—
<i>P. vulgaris</i>	56	—	—
<i>P. vulgaris</i>	60	—	—
<i>P. vulgaris</i>	70	+	—
<i>P. vulgaris</i>	74	+	—
<i>P. mirabilis</i>	6	+	—
<i>P. mirabilis</i>	18	+	—
<i>P. mirabilis</i>	23	+	+
<i>P. mirabilis</i>	24	+	—
<i>P. mirabilis</i>	32	+	—
<i>P. mirabilis</i>	35	+	+
<i>P. mirabilis</i>	41	+	+
<i>P. mirabilis</i>	46	+	—
<i>P. mirabilis</i>	54	—	—
<i>P. mirabilis</i>	55	+	—
<i>P. mirabilis</i>	61	+	—
<i>P. mirabilis</i>	68	+	+

Примітка: « + » - наявність ознаки,
« - » - відсутність ознаки

Виявлення позитивної реакції враховували впродовж 4 – х діб. На першу добу лецитіназу виявили у тих чотирьох штамів *P. mirabilis*, позитивна реакція яких співпала на обох поживних середовищах, що вказує на їх високу активність. Через 48 годин позитивну реакцію дали ще 6 штамів *P.mirabilis* та один із штамів *P.vulgaris* (33.33%). Інші 4 штами (19.05%) *P.vulgaris* дали позитивну реакцію на 3 та 4 добу випробування. Виявлення лецитинази у більш тривалий термін не відбулося. Ці дані вказують не лише на придатність використання запропонованого середовища для одночасного виявлення лецитіназної активності та пригнічення роїння, а й на його чутливість.

Загалом лецитіназну активність серед штамів *P.vulgaris* виявили 44.44%, серед штамів *P.mirabilis* –

91.66%, що може пояснюватись походженням штамів: фермент частіше зустрічається у штамів, виділених при гнійно – запальних процесах (більшість яких склали штами *P.mirabilis*).

Порівняне вивчення лецитіназної активності центрифугатів 5 - добових бульйонних культур штамів, що знаходились у Н- та О- формі показало, що активність ферменту була вища у протеїв в О- формі (таблиця 2).

Контрольний штам *S.aureus* ATCC 25923 дав позитивну реакцію у всіх дослідах, *Proteus vulgaris* ATCC 4636 не виявив лецитіназної активності у жодному з досліджень.

Таблиця 2. Лецитіназна активність протею в О- та Н- формі (хв.)

Вид мікроорганізму	№ штаму	Лецитіназна активність протею в О - формі	Лецитіназна активність протею в Н - формі
<i>P. vulgaris</i>	ATCC 4636	0	0
<i>P. vulgaris</i>	19	17	33

P. vulgaris	21	54	0
P. vulgaris	27	43	0
P. vulgaris	43	0	0
P. vulgaris	56	0	0
P. vulgaris	60	50	0
P. vulgaris	70	22	41
P. vulgaris	74	47	0
P. mirabilis	6	33	48
P. mirabilis	18	23	55
P. mirabilis	23	2	14
P. mirabilis	24	45	0
P. mirabilis	32	38	0
P. mirabilis	35	3	7
P. mirabilis	41	4	7
P. mirabilis	46	22	45
P. mirabilis	54	47	58
P. mirabilis	55	17	33
P. mirabilis	61	15	21
P. mirabilis	68	3	8

Висновки

1. Мікроорганізми роду *Proteus* володіють лецитіназою активністю, яка залежить від походження штамів та різко зростає з переходом протею з Н- у О-форму. Знаходження цієї ознаки може бути додатковим тестом для визначення вірулентності протеїв.

2. Запропоноване щільне поживне середовище є високочутливим та придатним для використання при одночасному виявленні лецитіназної активності та пригнічення роїння протеїв.

3. Перевагою даного середовища є можливість визначення лецитіназної активності не лише у протеїв, а й серед інших видів мікроорганізмів, які зустрічаються в асоціаціях з ним при запальних процесах. Використання запропонованого середовища в мікробіологічній практиці дозволить підвищити якість досліджень.

Список літератури

- Dennis E. A. The enzymes [Text] / Dennis E. A. // N. Y.- L. - 1983 - 3 ed.- Vol. 16. - p. 307-353.
- Ocampo J. The antibacterial activity of phospholipase A(2) type IIA is regulated by the cooperative lipid chain melting behavior in *Staphylococcus aureus* [Text] / Ocampo J., Afanador N., Vives M.J., Moreno J.C., Leidy C // Biochim. Biophys. Acta. 2010. – Vol. 1798(6). - p. 1021- 10288.
- Aronson A.I. Plasmid-Encoded Regulator of Extracellular Proteases in *Bacillus anthracis* [Text] / Aronson A.I., Bell C., Fulroth B // J. Bacteriol. - 2005. – Vol. 187. – p. 3133 - 3138.
- Steffen E. K. Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections [Text] / Steffen E. K., Hentges D J. // J. Clin. Microbiol.- 1981. – Vol. 14. – p.153 - 156.
- Temaru E. Clostridium tetani Is a Phospholipase(Lecithinase)-Producing Bacterium [Text] / Temaru E., Shimura S., Karasawa T. // J. Clin. Microbiol. – 2005.- Vol. 43. - p. 2024 - 2025.
- Belas R. *Proteus mirabilis* Detective in Swarmer Cell Differentiation and Multicellular Behavior [Text] / Belas R., Erskine D., Flaherty D // J. Bacteriol.- 1991- Vol.173.- p.6279-6288.
- Патент № 23150 (UA) МПК (2006): C12N 1/20. Живильне середовище для пригнічування роїння бактерій роду *Proteus* [Текст] / Осолодченко Т.П., Кучма І.Ю., Волянський А.Ю. і співавтор. (Україна). - № 200613244; Заявл. 14.12.2006; Опубл. 10.05.2007. – 3 с.
- Нестерова Г.Н. Биология протея [Текст] / Учебное пособие.- Горький: ГГУ.- 1972.- 88 с.

УДК 576.851.47.078.39

ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕЦИТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *PROTEUS* Юрченко Л.А.

Метою дослідження було вивчити особливості патогенезу протейних гнійно – запальних інфекцій та роль у ньому лецитинази збудника. Лецитіназну активність серед штамів *P.vulgaris* виявили 44.44%, серед штамів *P.mirabilis* – 91.66%. Було розроблене тверде поживне середовище, високочутливе та придатне для використання для одночасного виявлення лецитіназної активності та пригнічення роїння. Використання запропонованого середовища в мікробіологічній практиці дозволить підвищити якість досліджень.

Ключові слова: лецитіназа, протеї, пригнічення роїння.

УДК 576.851.47.078.39

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕЦИТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *PROTEUS* Юрченко Л.А.

Целью исследования было изучение особенностей патогенеза протейных гнойно – воспалительных инфекций и роль в них возбудителя. Лецитиназную активность проявили 44.44% штаммов *P.vulgaris* и 91.66% штаммов *P.mirabilis*. Была разработана плот-

ная питательная среда, высокочувствительная и пригодная для одновременного обнаружения лецитиназной активности и подавления роения. Использование предложенной питательной среды в микробиологической практике позволит повысить качество исследований.

Ключевые слова: лецитиназа, протеи, подавление роения.

УДК 576.851.47.078.39

DETERMINATION OF LECITHINASE ACTIVITY OF PROTEUS

Yurchenko L.A.

A research purpose was a study of features of Proteus pathogeny festering - inflammatory infections and role in them exciter. Lecithinase activity was shown by 44.44% cultures of P.vulgaris and 91.66% cultures of P.mirabilis. Nutrient medium was developed highly sensitive and suitable for the simultaneous discovery of lecithinase activity and suppression of swarming. The use of this nutrient medium in microbiological practice will allow to promote quality of researches.

Key worlds: lecithinase, Proteus, ingibition of sworming.