

ОЛЬГА ПЕТРОВНА КОМКОВА

старший преподаватель кафедры неврологии, психиатрии и микробиологии Медицинского института, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)

vanlis@petrsu.ru

АНТОНИНА МИХАЙЛОВНА ОБРАЗЦОВА

кандидат медицинских наук, доцент кафедры неврологии, психиатрии и микробиологии Медицинского института, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)

vanlis@petrsu.ru

НАТАЛЬЯ АНАТОЛЬЕВНА СИДОРОВА

кандидат биологических наук, доцент кафедры неврологии, психиатрии и микробиологии Медицинского института, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)

vanlis@petrsu.ru

АНТИЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННОЙ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЕСТЕСТВЕННОЙ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИДА*

Биологические и экологические особенности большинства видов условно-патогенной микрофлоры часто связывают с феноменом персистенции. В качестве объективного маркера персистенции *Escherichia coli* в организме человека и воде поверхностных водоемов предлагается использовать антилизоцимную активность (АЛА), а также связь антилизоцимного признака с функциональными и биохимическими характеристиками бактерий. С помощью определения частоты и интенсивности АЛА и адгезивных свойств *E. coli* описаны специфические биопрофили микроорганизма и установлена степень распространения антилизоцимной активности на разных этапах естественной циркуляции вида.

Ключевые слова: лизоцим, антилизоцимная активность, факторы персистенции, *Escherichia coli*

ВВЕДЕНИЕ

Отсутствие объективной информации о биологических и экологических особенностях условно-патогенных микроорганизмов часто связывают с фенотипическим полиморфизмом, возникающим вследствие длительной персистенции видов в биотических и абиотических объектах окружающей среды. По мнению О. В. Бухарина [6], объективным маркером персистенции многих бактерий может являться активность деградации лизоцима – гуморального фактора неспецифической резистентности макроорганизма. Лизоцим в норме содержится в различных биологических жидкостях; обладает свойствами мурамидазы, катализирует гидролиз β -1-4-гликозидных связей между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой, что приводит к разрушению пептидогликана в составе клеточных стенок бактерий [11]. К настоящему времени у многих патогенных и условно-патогенных бактерий обнаружена способность связывать лизоцим и проявлять АЛА [6], [7], [8]. АЛА выявлена у большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*: шигелл, сальмо-

нелл, эшерихий, иерсений и др. Установлено, что данный биологический феномен связан с секрецией специфического антилизоцимного фактора, что коррелирует с внутриклеточным паразитированием и более выражено у микробных культур с высоким уровнем АЛА [4]. АЛА, опосредованная плазмидой с молекулярной массой 50–60 МД, обнаружена у *Klebsiella pneumoniae*; описан механизм возникновения антилизоцимной активности и его роль в формировании множественных биотических связей между различными видами микроорганизмов в природных экосистемах [1]. Однако нет достаточных сведений о роли АЛА на разных этапах естественной циркуляции полигастальных и убиквитарных видов условно-патогенных микроорганизмов. В связи с выше-сказанным целью данного исследования явилась оценка антилизоцимной активности *Escherichia coli*, изолированной из организма человека (естественной среды развития) и воды поверхностных водоемов (среды переживания бактерий).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования использованы репрезентативные клоны *Escherichia coli*, выделенные

из организма человека ($n = 264$) и микрофлоры Петрозаводской ($n = 65$) и Кондопожской губы ($n = 70$) Онежского озера в течение 2013–2015 годов. Из 399 культур 134 штамма явились клиническими, так как изолированы в чистую культуру от лиц с различными патологиями желудочно-кишечного тракта. Группу сравнения составили штаммы, выделенные от практически здоровых людей ($n = 130$). Видовая идентификация *E. coli* проводилась с помощью Chromacult Coliform Agar (фирмы Merck KGaA, Германия), культивирование осуществлялось на стандартных средах. Определение частоты и интенсивности АЛА проводилось фотометрическим методом [4] в диапазоне концентрации лизоцима от 1 до 10 мкг/мл. Для эксперимента использовали суточную культуру *Escherichia coli*. Для определения антилизоцимной активности использовался коммерческий препарат лизоцима отечественного производства, а в качестве тест-культуры – штамм *Micrococcus luteus*, предварительно обработанный трилоном Б. Об уровне АЛА судили по степени лизиса суспензии тест-культуры микрококка. Для оценки уровня антилизоцимной активности использованы следующие критерии: низкий уровень – антилизоцимная активность 1–2 мкг/мл, средний – 3–6 мкг/мл, высокий – выше 6 мкг/мл. Параллельно изучались адгезивные свойства *E. coli* по методу В. И. Брилис с соавторами [3], оценивались параметры СПА – количество бактериальных клеток, адгезированное на одном эритроците; КУА – коэффициент участия эритроцитов и ИАМ – индекс адгезии микроорганизмов. Статистическая обработка фактического материала предусматривала расчет среднего арифметического значения признака M , ошибки средней арифметической m и среднего квадратичного отклонения σ .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Важной отличительной особенностью микробных сообществ является их способность быстро реагировать на изменение качества окружающей среды фенотипическим полиморфизмом комплекса физиологических и биохимических признаков. В результате исследований установлено, что для клинических вариантов *E. coli* и культур в составе микрофлоры воды открытого водоема характерно значительное изменение физиологической и ферментативной активности (табл. 1). Способность к сбраживанию глюкозы до газа проявилась лишь у 65 % *E. coli*, выделенной от лиц с патологиями ЖКТ. В составе микрофлоры Петрозаводской губы обнаружено 58 %, а в составе микрофлоры Кондопожской губы – 42 % подобных вариантов. Минимальная способность

Таблица 1
Функциональная и ферментативная активность изолятов *Escherichia coli*, %

Показатель	Группа сравнения ($n = 130$)	Больные с патологией ЖКТ ($n = 134$)	Вода открытого водоема	
			Петrozаводская губа ($n = 65$)	Кондопожская губа ($n = 70$)
Сбраживание глюкозы (Γ^*)	97	65	58	42
Сбраживание лактозы	95	53	64	51
Образование индола	99	62	53	43
Подвижность	84	57	54	47

Примечание. Γ^* – сбраживание глюкозы до газа.

к гидролизу лактозы (51 %), аммонификации белков до индола (43 %) и подвижности (47 %) обнаружена у штаммов, выделенных из микрофлоры воды Кондопожской губы Онежского озера.

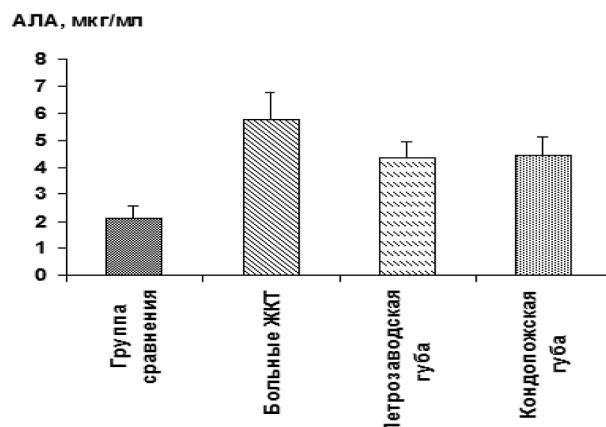
У подавляющего большинства микроорганизмов определялась АЛА – $71,768 \pm 0,11\%$ (286). Способность инактивировать лизоцим выявлена для 28,5 % культур *E. coli* из группы сравнения, 80 % – из Петрозаводской губы Онежского озера, 90 % – из Кондопожской губы. Для клинических изолятов *Escherichia coli* установлена 100-процентная антилизоцимная активность (при $P < 0,01$) (табл. 2).

Таблица 2
Распространение АЛА у выделенных культур *Escherichia coli*

Источник выделения	Число штаммов с АЛА	Частота АЛА, %	АЛА, мкг/мл е. о. п.
Группа сравнения	37	28,5	$0,067 \pm 0,010$
Больные с патологией ЖКТ	134	100	$0,256 \pm 0,014$
Петрозаводская губа Онежского озера	52	80	$0,211 \pm 0,011$
Кондопожская губа Онежского озера	63	90	$0,219 \pm 0,012$

Проведенные исследования позволили установить средние значения исследуемых признаков. Динамика величины антилизоцимной активности *Escherichia coli* в зависимости от этапа циркуляции вида представлена на рисунке. Наиболее выраженная антилизоцимная активность с высокими и умеренными значениями показателя обнаружена у вариантов *E. coli*, выделенной из организма людей с различными патологиями ЖКТ. У 64,9 % (87 штаммов) антилизоцимная активность находилась в пределах 5–6 мкг/мл, у 29,1 % (39 штаммов) – 4 мкг/мл, у 5,9 % (8 штаммов) – 3 мкг/мл.

Адгезия является основным механизмом для инициации формирования микробных биопленок как в организме человека и животных, так и в



Антилизоцимная активность *Escherichia coli*, выделенной на разных этапах циркуляции вида

объектах окружающей среды [9]. С помощью исследования адгезивного потенциала исследуемых групп *E. coli* установлено, что ИАМ, выделенных из организма больных людей ($6,27 \pm 1,49$), в два раза превышал значения для группы сравнения – $3,24 \pm 0,64$ и в полтора раза был выше значений для *E. coli*, выделенной из микрофлоры воды Онежского озера ($4,11 \pm 1,24$ и $5,29 \pm 1,37$). Полученные данные соответствовали СПА – количеству бактериальных клеток, которые адгезировались на одном эритроците. СПА для группы сравнения составил $1,5 \pm 0,62$, для лиц с патологией ЖКТ – $4,2 \pm 1,6$, а для *E. coli*, выделенной из микрофлоры воды Онежского озера, – $3,7 \pm 2,2$ и $3,2 \pm 1,9$ (табл. 3). Коэффициент участия эритроцитов в адгезии изменялся от $73 \pm 8,7$ (группа сравнения) до $92 \pm 6,4$ (лица с патологией ЖКТ).

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований установлено, что биопрофиль *Escherichia coli*, выделенной на различных этапах циркуляции вида – организма человека и воды поверхностных водоемов – характеризуется наличием комплекса

Таблица 3
Адгезивная активность выделенных культур *Escherichia coli*

Источник выделения	СПА	КУА	ИАМ
Группа сравнения	$1,5 \pm 0,62$	$73 \pm 8,7$	$3,24 \pm 0,64$
Больные с патологией ЖКТ	$4,2 \pm 1,6$	$92 \pm 6,4$	$6,27 \pm 1,49$
Петрозаводская губа Онежского озера	$3,7 \pm 2,2$	$86 \pm 7,2$	$4,11 \pm 1,24$
Кондопожская губа Онежского озера	$3,2 \pm 1,9$	$82 \pm 6,9$	$5,29 \pm 1,37$

факторов персистенции, включающего как антилизоцимную, так и адгезивную активность. Высокие значения показателя деградации лизоцима, характерные для эшерихий, выделенных у лиц с патологией ЖКТ, можно объяснить воспалительными процессами в области слизистой оболочки кишечника, сопряженными с усиленной секрецией экзокриноцитами толстой кишки эндогенного лизоцима. Нахождение *E. coli* в среде переживания бактерий – воде открытого водоема – связано с освоением новой экологической ниши, что, вероятно, и приводит к компенсаторному увеличению антилизоцимной активности. Причем выраженная АЛА для штаммов, выделенных из организма людей с нарушениями ЖКТ, оказалась значительно выше, чем для культур, выделенных от людей из группы сравнения ($P < 0,01$). Можно предположить, что обнаруженная активность вида в отношении деградации лизоцима направлена на активацию адгезии и переживание эшерихий в соответствующей экологической нише. Этому способствует также изменение функциональной и биохимической активности вида, персистирующего в водоеме и в макроорганизме с микроэкологическими нарушениями. Полученные результаты согласуются с данными других авторов [2], [5], [10] и необходимы для правильного понимания биологических и экологических особенностей условно-патогенных микроорганизмов, имеющих различные этапы циркуляции видов в природе.

* Работа проводилась в соответствии с НИР Лаборатории доклинических исследований, клеточной патологии и регуляции Института высоких биомедицинских технологий ПетрГУ по направлению «Исследование биологической активности убиквитарных и полигастальных форм микроорганизмов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бозиев В. Б. Антилизоцимная активность энтеробактерий: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 1995. 16 с.
- Бочкарева О. П., Красноженов Е. П., Гольдберг В. Е., Дубовцева С. В., Подоплекин Д. М., Симолина Е. И. Функциональные и биологические свойства *Escherichia coli*, выделенной от больных раком легких // Сибирский онкологический журнал. 2014. № 14. С. 44–47.
- Брилис В. И., Брилене Т. А., Ленцнер Х. П., Ленцнер А. А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. 1986. № 4. С. 210–212.
- Бухарин О. В., Усвяцов Б. Я., Малышкин А. П., Немцева Н. В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1984. № 2. С. 27–28.

5. Бухарин О. В., Усвятов Б. Я. Бактерионосительство (медицинско-экологический аспект). Екатеринбург: УрОРАН, 1996. 206 с.
6. Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2000. № 4. С. 4–7.
7. Бухарин О. В., Валышев А. В., Елагина Е. Е. Антилизоцимная активность анаэробных бактерий фекальной микрофлоры человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2000. № 5. С. 20–22.
8. Бухарин О. В. Персистенция микроорганизмов. Екатеринбург: УрОРАН, 2009. 366 с.
9. Грузина В. Д. Коммуникативные сигналы бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48. № 10. С. 32–39.
10. Ляшенко И. Э. Факторы персистенции *Escherichia coli*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Оренбург, 1995. 23 с.
11. Комкова О. П., Образцова А. М., Сидорова Н. А. Основы конституционального иммунитета. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2004. 53 с.

Komkova O. P., Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)
 Obraztsova A. M., Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)
 Sidorova N. A., Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)

ANTILYZOCYME ACTIVITY OF *ESCHERICHIA COLI*, ALLOCATED AT DIFFERENT STAGES OF SPECIES NATURAL CIRCULATION

Biological and ecological characteristics of most types of potentially-pathogenic microorganisms still remain studied insufficiently, the fact often associated with the phenomenon of persistence. Antilyzocyme activity (ALA) and association of antilyzocyme tag with functional and biochemical characteristics of bacteria are proposed to be used as an objective marker of persistence of *Escherichia coli* in the human body and surface waters of reservoirs. Specific microorganism bioprofiles have been described and the degree of antilyzocyme activity spread at different stages of natural species circulation has been established using determined values of frequency and intensity of ALA and adhesive properties of *E. coli*.

Key words: lyzocyme, antilyzocyme activity, persistence factors, *Escherichia coli*

REFERENCES

1. Boziev V. B. *Antilizotsimnaya aktivnost' enterobakteriy: Aftoref. diss. ... kand. biol. nauk* [Antilyzocyme activity of enterobacteria: Author's abst. PhD. biol. sci. diss]. Rostov-on-Don, 1995. 16 p.
2. Bochkareva O. P., Krasnozhenov E. P., Gol'dberg V. E., Dubovtseva S. V., Podoplekin D. M., Simolina E. I. Functional and biological properties of *Escherichia coli* gathered from patients with lung cancer [Funktional'nye i biologicheskie svoystva *Escherichia coli*, vydelennykh ot bol'nykh rakom legkikh]. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2014. № 14. P. 44–47.
3. Brilis V. I., Brilene T. A., Lentsner K. H. P., Lentsner A. A. Technique of microorganisms adhesive process research. [Metodika izucheniya adgezivnogo protessa mikroorganizmov]. *Laboratornoe delo*. 1986. № 4. P. 210–212.
4. Bukharin O. V., Usyatsov B. Ya., Malyshkin A. P., Nemtseva N. V. A method of determining the antilyzocyme activity of microorganisms [Metod opredeleniya antilizotsimnoy aktivnosti mikroorganizmov]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 1984. № 2. P. 27–28.
5. Bukharin O. V., Usyatsov B. Ya. *Bakterionositel'stvo (mediko-biologicheskiy aspect)* [Bacteria carrying (biomedical aspect)]. Ekaterinburg, UrORAN Publ., 1996. 206 p.
6. Bukharin O. V. Persistence of pathogenic bacteria: theory and practice [Persistentsiya patogennykh bakteriy: teoriya i praktika]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2000. № 4. P. 4–7.
7. Bukharin O. V., Valyshev A. V., Elagina E. E. Antilysozyme activity of anaerobic bacteria from fecal microflora in man [Antilizotsimnaya aktivnost' anaerobnykh bakteriy fekal'noy mikroflory cheloveka]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2000. № 5. P. 20–22.
8. Bukharin O. V. *Persistentsiya mikroorganizmov* [Persistence of microorganisms]. Ekaterinburg, UrORAN Publ., 2009. 366 p.
9. Gruzina V. D. Bacteria communicative signals [Kommunikativnye signaly bakteriy]. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2003. Vol. 48. № 10. P. 32–39.
10. Lashenko I. E. *Faktory persistentsii Escherichia coli: Aftoref. diss. ... kand. med. nauk* [The persistence factors of *Escherichia coli*: Author's abst. PhD. med. sci. diss]. Orenburg, 1995. 23 p.
11. Komkova O. P., Obraztsova A. M., Sidorova N. A. *Osnovy konstitutusional'nogo immuniteta* [The foundations of autarcesis]. Petrozavodsk, PetrGU Publ., 2004. 53 p.

Поступила в редакцию 05.11.2015