

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 324 (2017), 163 – 169

I. A. Ratnikova, N. N. Gavrilova, K. Bayakyshova,
Z. Zh. Turlybayeva, L. A. Kosheleva, O. G. Chugay

RGP "Institute of Microbiology and Virology" of KN of MAUN RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: iratnikova@list.ru

LYSOZYME AND ANTI-INTERFERON ACTIVITY OF STRAINS OF THE LACTIC AND PROPIONIC ACID BACTERIA WHICH ARE A PART OF A PROBIOTIC POLILAKTOBAK

Abstract. Presence of lysozyme and anti-interferon activity at strains of the lactic and propionic acid bacteria which are grown up on two nutrient mediums is studied: MRS and on whey with barmy extract. The activity was defined in liquid cultures and sublimationally by +10% of SOM which are dried up from 7% of sucrose. It is established that in the liquid and dried-up cultures of lactic (*Lactobacillus cellobiosus* 20, *Lactobacillus brevis* 139, *Lactobacillus plantarum* 14d) and propionic sour bacteria (*Propionibacterium shermanii*-2/10) which are a part of the probiotic Polilaktobak intended for treatment the hospitalnykh of infections have lysozyme activity and have no anti-interferon activity (with interferon in concentration 1:40 and 1:60) that promotes increase in therapeutic efficiency of the offered pro-biotic medicine. Results of researches can make a contribution to development of ideas of a range of biological activity of pro-biotic medicines that will allow using more widely them for prevention and treatment of various diseases.

Keywords: probiotic, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, lysozyme activity, anti-interferon activity.

УДК 579:864.1:57.008.6:577.115

И. А. Ратникова, Н. Н. Гаврилова, К. Баякышова,
З. Ж. Турлыбаева, Л. А. Кошелева, О. Г. Чугай

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

ЛИЗОЦИМНАЯ И АНТИИНТЕРФЕРОНОВАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ И ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ПРОБИОТИКА ПОЛИЛАКТОБАК

Аннотация. Изучено наличие лизоцимной и антиинтерфероновой активности у штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий, выращенных на двух питательных средах: МРС и на молочной сыворотке с дрожжевым экстрактом. Активность определяли в жидких культурах и сублимационно высушенных с 7% сахарозы+10% СОМ. Установлено, что в жидких и высушенных культурах молочнокислых (*Lactobacillus cellobiosus* 20, *Lactobacillus brevis* 139, *Lactobacillus plantarum* 14d) и пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium shermanii*-2/10), входящих в состав пробиотика Полилактобак, предназначенного для лечения госпитальных инфекций, обладают лизоцимной активностью и не имеют антиинтерфероновой активности (с интерфероном в концентрации 1:40 и 1:60), что способствует повышению терапевтической эффективности предлагаемого пробиотического препарата. Результаты исследований могут внести вклад в развитие представлений о спектре биологической активности пробиотических препаратов, что позволит более широко использовать их для профилактики и лечения различных заболеваний.

Ключевые слова: пробиотик, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, лизоцимная активность, антиинтерфероновая активность.

Успешное развитие производства препаратов с пробиотическими свойствами сопряжено с актуальной проблемой получения высокоактивных штаммов лакто- и бифидобактерий, способных подавлять рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов за счет продукции биологически активных веществ, конкуренции за лимитируемые нутриенты и сайты адгезии на кишечной стенке; влияния на ферментативную активность желудочно-кишечного тракта и стимуляции иммунной системы организма хозяина [1-4].

В настоящее время на рынке появилось много пробиотических препаратов и БАДов на основе живых микроорганизмов. Характеристика их эффективности представлена достаточно широко [5-18]. Вместе с тем, известные лечебно-профилактические препараты против кишечных инфекций, состоящие из молочнокислых и бифидобактерий, не всегда эффективны, так как имеют недостаточно широкий антимикробный спектр действия. Одним из факторов, определяющих антагонистическую активность пробиотических микроорганизмов является их способность к синтезу лизоцима, который обуславливает определенные селективные преимущества в микробном ценозе [19]. Известно, что некоторые микроорганизмы могут разрушать интерферон, содержащийся в крови человека и животных и играющий важную роль в обеспечении иммунной защиты организма [20]. Детальное изучение особенностей лечебно-профилактических препаратов, основанных на различных видах микроорганизмов, представляется актуальным, так как определяет пути практического применения каждого биопрепарата.

Целью наших исследований было изучение лизоцимной и антиинтерфероновой активности пробиотика Полилактобак, предназначенного для профилактики и лечения госпитальных инфекций.

Методы исследования. Лизоцимную активность определяли по методу J. Nawiger. Результаты оценивали по наличию зон лизиса микрококка вокруг колоний исследуемых штаммов [21].

Для определения антиинтерфероновой активности использовали человеческий лейкоцитарный интерферон В, качестве тест-культуры использовали *Corinebacterium xerosis*. По наличию или отсутствию роста тест культуры судили о способности исследуемых штаммов к разрушению интерферона [22].

Обсуждение результатов. Лизоцимную и антиинтерфероновую активность определяли у штаммов молочнокислых бактерий *L. cellobiosus* 20, *L. brevis* 139, *L. plantarum* 14д и пропионово-кислых бактерий *P. shermanii* 2/10, входящих в состав пробиотика Полилактобак. Штаммы выращивали на двух питательных средах: МРС и на молочной сыворотке с дрожжевым экстрактом. Активность определяли в жидких культурах и сублимационно высушенных с 7% сахарозы + 10% СОМ.

Для определения лизоцимной активности в качестве тест-микроорганизма использовали *Micrococcus luteus*.

Культуру *M. luteus* выращивали в течение 24 час в термостате при 37°C, затем ее смывали со скошенного агара 0,5%-ным раствором NaCl и стерилизовали в автоклаве при 1 атм. в течение 15 мин. Взвесь убитой тест-культуры помещали в пробирки с 15мл 0,7%-ного питательного агара с температурой 50°C из расчета 10⁹ клеток на 1 мл среды и тщательно перемешивали. Затем агаровую среду с внесенными в нее убитыми микрококками разливали чашки Петри и, после застывания, подсушивали в термостате при 37°C в течение двух час. На поверхность подсушенного агара наносили в виде капель исследуемые культуры молочнокислых бактерий. На одну чашку Петри помещали 7-8 исследуемых культур. Результат учитывали через 24-48 час инкубации по зонам лизиса вокруг микроколоний.

Выявлено, что все исследуемые штаммы молочнокислых бактерий обладают лизоцимной активностью. Зоны лизиса тест-культуры *M. luteus* пробиотическими культурами при росте на среде МРС составили для *L. cellobiosus* 20 – 12,0 мм; *L. brevis* 139 – 10,0; *L. plantarum* 14д – 13,5 мм. У пропионовокислых бактерий *P. shermanii*-2/10 лизоцимная активность не выявлена. После сублимационного высушивания лизоцимная активность у испытуемых молочнокислых бактерий сохранилась. При этом зона лизиса тест-культуры у штамма *L. plantarum* 14д изменились незначительно (12,5 мм), а у *L. brevis* 139 и *L. cellobiosus* 20 осталась на том же уровне (рисунок 1). Титр молочнокислых и пропионовокислых бактерий составлял до высушивания от 2,4 до 4,8х10⁹ КОЕ/мл, после высушивания от 2,2 до 4,5х10⁹ КОЕ/г (рисунок 2).

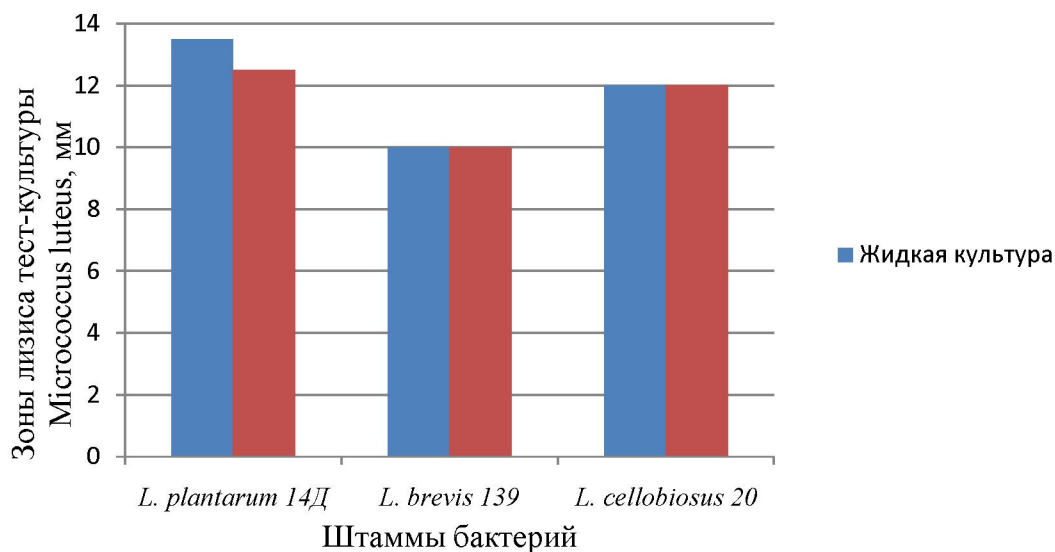


Рисунок 1 – Лизоцимная активность бактерий, входящих в состав пробиотика Полилактобак в жидком и сухом виде (на среде МРС)

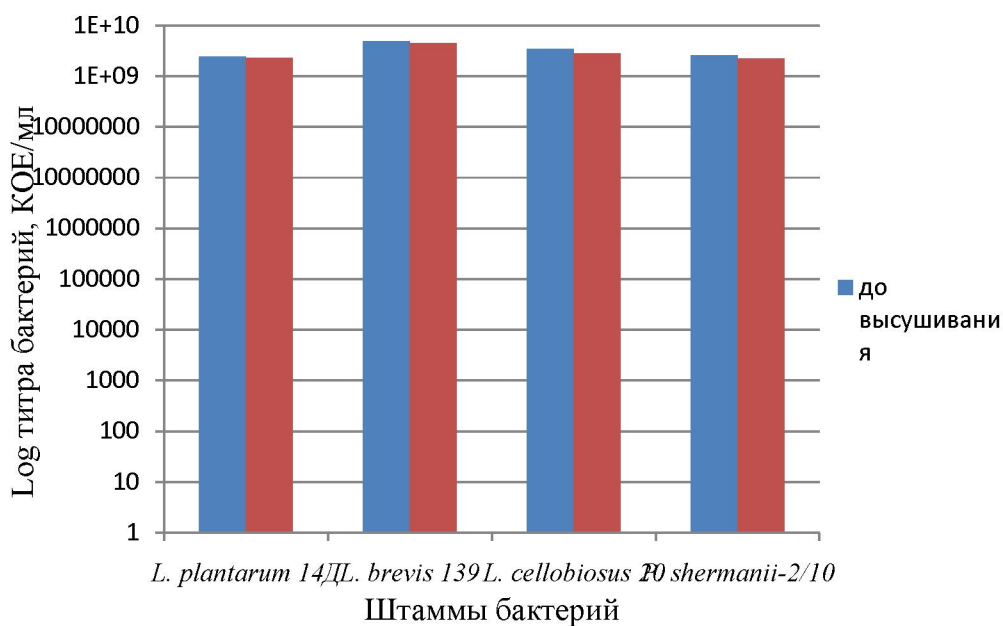


Рисунок 2 – Титр бактерий, входящих в состав пробиотика Полилактобак до и после высушивания на среде МРС

Зоны лизиса тест-культуры *M. luteus* пробиотическими культурами при росте на молочной сыворотке с дрожжевым экстрактом составили для *L. Cellobiosus* 20 – 11,5 мм; *L. brevis* 139 – 9,5; *L. plantarum* 14д – 13,0 мм. У пропионовокислых бактерий *P. shermanii*-2/10 лизоцимная активность не выявлена.

После сублимационного высушивания лизоцимная активность у испытуемых молочнокислых бактерий также сохранилась.

При этом зоны лизиса тест-культуры у штаммов *L. plantarum* 14д и *L. cellobiosus* 20 изменились незначительно, а у *L. brevis* 139 осталась на том же уровне (рисунок 3). Титр молочнокислых и пропионовокислых бактерий составлял до высушивания от 2,0 до 2,8 × 10⁹ КОЕ/мл, после высушивания от 1,8 × 10⁹ до 2,5 × 10⁹ КОЕ/г (рисунок 4).

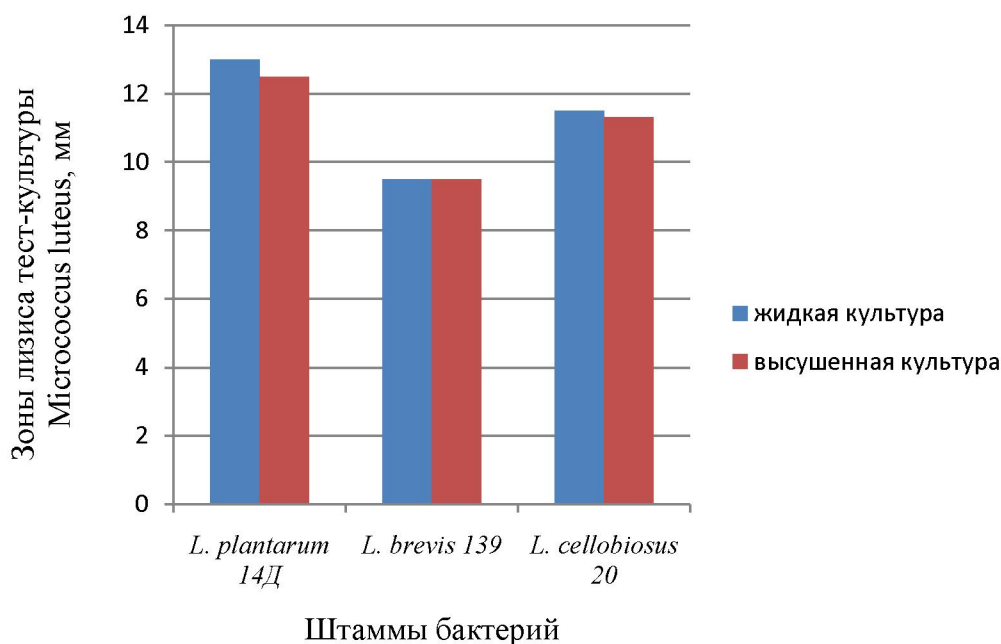


Рисунок 3 – Лизоцимная активность бактерий, входящих в состав пробиотика Полилактобак в жидком и сухом виде (на молочной сыворотке с дрожжевым экстрактом)

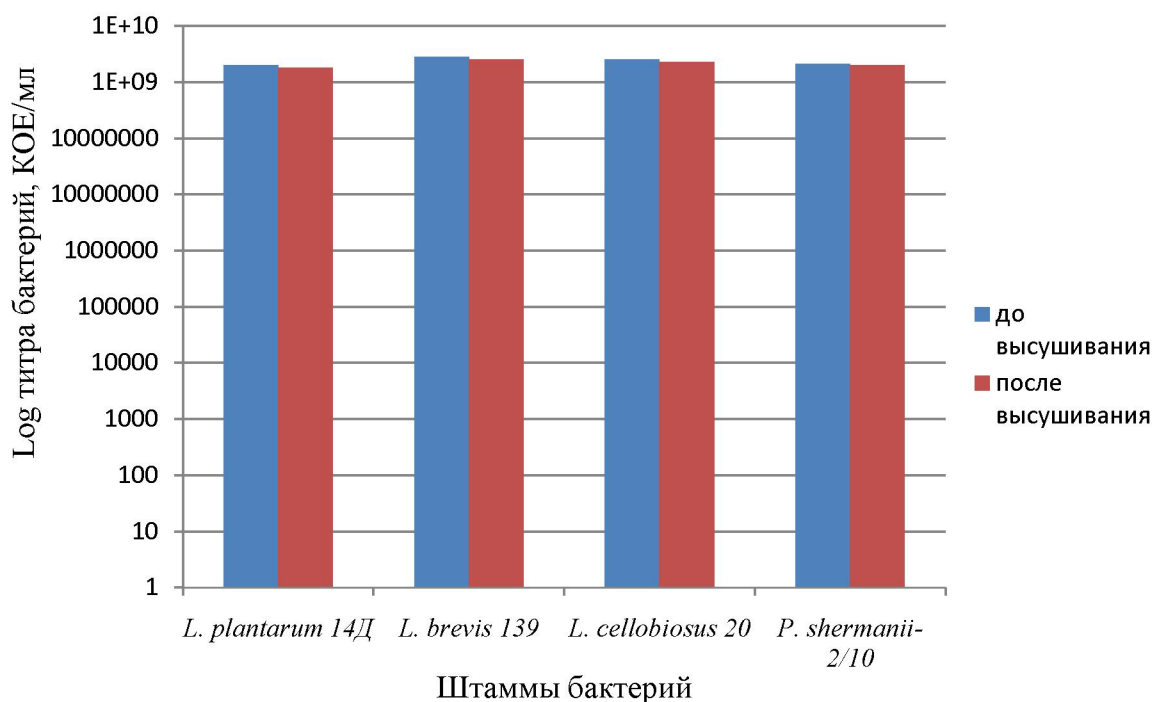


Рисунок 4 – Титр бактерий, входящих в состав пробиотика Полилактобак до и после высушивания на среде на основе молочной сыворотки с дрожжевым экстрактом

При определении антиинтерфероновой активности использовали человеческий лейкоцитарный интерферон в концентрациях 1:40 и 1:60, который вносили в мясопептонный агар (МПА) и затем разливали в чашки Петри. На остывший агар «пяточком» петлей засекали исследуемые штаммы бактерий из жидких и высушенных культур. После инкубации в течение суток при температуре 37°C проводили стерилизацию парами хлороформа. Одновременно в стерильные пробирки помещивали по 0,1 мл 500 млн. взвеси суточной тест – культуры и добавляли 3–4 мл 0,7%

агар-агара. В качестве тест-культуры использовали *Corinebacterium xerosis*. Содержимое пробирок перемешали и заливали чашки Петри поверх «пяточков». Далее следовал процесс инкубации в течение суток в термостате при температуре 37⁰С. По наличию роста тест-культуры судили о способности исследуемых штаммов к разрушению интерферона.

В процессе исследования установлено, что вокруг суточных колоний данных микроорганизмов не происходит роста тест-культуры *C. xerosis* на среде МПА с интерфероном в концентрации 1:40 и 1:60. Это указывает на то, что *L. cellobiosus* 20, *L. brevis* 139, *L. plantarum* 14д, *P. shermanii*-2/10 как в жидких культурах, так и сублимационно высушенных не обладают антиинтерфероновой активностью.

Выводы. Таким образом, результаты исследования показали, что в жидких и высушенных культурах бактерий, входящих в состав пробиотика Полилактобак присутствует лизоцимная активность и отсутствует антиинтерфероновая активность.

Источник финансирования исследований. Комитет науки Министерство образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журн. микробиол. – 2004. – № 1. – С. 84-92.
- [2] Бондаренко В.М. Молекулярно-клеточные механизмы терапевтического действия пробиотиков // Фарматека. – 2005. – Т. 20, № 15. – С. 46-54.
- [3] Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Воробьева М.А. Механизм действия пробиотических препаратов // Биопрепараты. – 2003. – № 3. – С. 54.
- [4] Онищенко Г.Г., Алепкин В.А., Афанасьев С.С. и др. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии. – М.: Наука, 2002. – 118 с.
- [5] Кутлиева Г.Д., Огай Д.К. Антагонистические свойства пробиотиков по отношению к клиническим штаммам *Helicobacter pylori* in vitro // Мат-лы 3-го Московского междунар. конгресса “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. – М., 2005. – С. 88.
- [6] Lievin V., Peiffer I., Hudault S. et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity // Gut. – 2000. – Vol. 47. – P. 646-652.
- [7] Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition // Am. J. Clin. Nutr. – 2001. – Vol. 73. – P. 365-373.
- [8] Grill J.P., Crociani J., Ballongue J. Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines // Letts. Appl. Microbiol. – 1995. – Vol. 20. – P. 328-330.
- [9] Корниенко Е.А. Современные принципы выбора пробиотиков // Детские инфекции. – 2007. – № 3. – С. 64-69.
- [10] Fitzpatrick L.R. et al. Effects of the probiotic formulation VSL3 on colitis in weanling rats // J. Ped. Gastroenterol. Nutr. – 2007. – Vol. 44, № 5. – P. 561-570.
- [11] Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Под ред. Г. Г. Онищенко, В. А. Алешкина, С. С. Афанасьева, В. В. Поспелова. – М.: ГОУ ВУНМЦ Минздрава РФ, 2002. – 608 с.
- [12] Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 50-55.
- [13] Schiffrin E.J., Rochat F., Linc-Amster H. et al. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria // J. Dairy Sci. – 1995. – Vol. 78. – P. 491-497.
- [14] Лопатина Т.К., Бляхер М.С., Николаенко В.Н. и др. Иммуномодулирующее действие препаратов-эубиотиков // Вестн. РАМН. – 1997. – № 3. – С. 30-34.
- [15] Драчева Л.В. Антиоксидантная активность пробиотических биокомпозиций // Клиническое питание. – 2007. – № 1-2. – С. 39.
- [16] Байбаков В.И., Плетнев В.Г., Александрович Н.Ж. Антиоксидантная активность нового биопродукта – кисломолочного бифидумбактерина “Бифишка” // Мат-лы 2-го междунар. конгресса по пробиотикам “Санкт-Петербург – Пробиотики-2009” в научно-практическом журнале “Гастрорентерология Санкт-Петербурга”. – 2009. – № 4. – С. 2.
- [17] Корниенко Е.А. Современные принципы выбора пробиотиков // Детские инфекции. – 2007. – № 3. – С. 64-69.
- [18] Савицкая И.С. Методологические принципы разработки комплексной биологически активной добавки с антимутагенными и пробиотическими свойствами: Автореф. ... д. б. н.: 03.00.07. – Алматы, 2010. – 35 с.
- [19] Нагызбеккызы Э., Ануарбекова С. С., Алмагамбетов К. Х. Пробиотические свойства коллекционных штаммов бактерий рода *Lactobacillus* // Инновации в науке: сб. ст. по матер. XV междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск: СибАК, 2012.

[20] Тимаков В.Д., Левашев В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. – М.: Медицина, 1983. – 517 с.

[21] Бисимбаева С.К., Иманбаева М.И., Калина Н.В. и др. Методы определения патогенных свойств возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний: методические рекомендации / Под ред. Ш. И. Сарбасовой. – Астана, 2000. – 19 с.

[22] А.с. 1564191. Способ определения антиинтерфероновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, В.Ю. Соколов; опубл. 15.05.93, Бюл. 18. – 2 с.

REFERENCES

[1] Bondarenko V.M., Vorob'ev A.A. Disbiozyipreparaty s probioticheskoj funkciej // Zhurn. mikrobiol. 2004. N 1. P. 84-92.

[2] Bondarenko V.M. Molekulyarno-kletochnye mekhanizmy terapevticheskogo dejstviya probiotikov // Farmateka. 2005. Vol. 20, N 15. P. 46-54.

[3] Bondarenko V.M., Chuprinina R.P., Vorob'eva M.A. Mekhanizm dejstviya probioticheskikh preparatov // Biopreparaty. 2003. N 3. P. 54.

[4] Onishchenko G.G., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S. i dr. Immunobiologicheskie preparaty i perspektivy ih primeneniya v infektologii. M.: Nauka, 2002. 118 p.

[5] Kutlieva G.D., Ogaj D.K. Antagonisticheskie svoystva probiotikov po otnosheniyu k klinicheskim shtammam Helicobacter pylori in vitro // Mat-ly 3-go Moskovskogo mezhdunar. kongressa "Biotekhnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya". M., 2005. P. 88.

[6] Lievin V., Peiffer I., Hudault S. et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity // Gut. 2000. Vol. 47. P. 646-652.

[7] Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition // Am. J. Clin. Nutr. 2001. Vol. 73. P. 365-373.

[8] Grill J.P., Crociani J., Ballongue J. Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines // Letts. Appl. Microbiol. 1995. Vol. 20. P. 328-330.

[9] Kornienko E.A. Sovremennye principy vybora probiotikov // Detskie infekcii. 2007. N 3. P. 64-69.

[10] Fitzpatrick L.R. et al. Effects of the probiotic formulation VSL3 on colitis in weanling rats // J. Ped. Gastroenterol. Nutr. 2007. Vol. 44, N 5. P. 561-570.

[11] Immunobiologicheskie preparaty i perspektivy ih primeneniya v infektologii / Pod red. G. G. Onishchenko, V. A. Aleshkina, S. S. Afanas'eva, V. V. Pospelova. M.: GOU VUNMC Minzdrava RF, 2002. 608 p.

[12] Glushanova N.A. Biologicheskie svoystva laktobacill // Byulleten' sibirskoj mediciny. 2003. Vol. 2, N 4. P. 50-55.

[13] Schiffrin E.J., Rochat F., Linc-Amster H. et al. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria // J. Dairy Sci. 1995. Vol. 78. P. 491-497.

[14] Lopatina T.K., Blyaher M.S., Nikolaenko V.N. i dr. Immunomoduliruyushchee dejstvie preparatov-ehubiotikov // Vestn. RAMN. 1997. N 3. P. 30-34.

[15] Dracheva L.V. Antioksidantnaya aktivnost' probioticheskikh biokompozicij // Klinicheskoe pitanie. 2007. N 1-2. P. 39.

[16] Bajbakov V.I., Pletnev V.G., Aleksandrovich N.ZH. Antioksidantnaya aktivnost' novogo bioprodukta – kislomolochnogo bifidumbakterina "Bifishka" // Mat-ly 2-go mezhdunar. Kongressa po probiotikam "Sankt-Peterburg – Probiotiki-2009" v nauchno-prakticheskom zhurnale "Gasteroehnterologiya Sankt-Peterburga". 2009. N 4. P. 2.

[17] Kornienko E.A. Sovremennye principy vybora probiotikov // Detskie infekcii. 2007. N 3. P. 64-69.

[18] Savickaya I.S. Metodologicheskie principy razrabotki kompleksnoj biologicheski aktivnoj dobavki s antimutagenymi i probioticheskimi svoystvami: Avtoref. ... d.b.n.: 03.00.07. Almaty, 2010. 35 p.

[19] Nagyzbekyzy Eh., Anuarbekova S.S., Almagambetov K.H. Probioticheskie svoystva kollekcionnyh shtammov bakterij roda Lactobacillus // Innovacii v nauke: sb. st.po mater. XV mezhdunar. nauch.-prakt. konf. Novosibirsk: SibAK, 2012.

[20] Timakov V.D., Levashev V.S., Borisov L.B. Mikrobiologiya. M.: Medicina, 1983. 517 p.

[21] Bisimbaeva S.K., Imanbaeva M.I., Kalina N.V. i dr. Metody opredeleniya patogennyh svoystv vzbuditelej gnojno-vospalitel'nyh zaboolevanij: metodicheskie rekomendacii / Pod red. Sh. I. Sarbasovoj. Astana, 2000. 19 p.

[22] А.с. 1564191. Sposob opredeleniya antiinterferonovoj aktivnosti mikroorganizmov / О.В. Бухарин, В.Ю. Соколов; опубл. 15.05.93, Бюл. 18. 2 p.

**И. А. Ратникова, Н. Н. Гаврилова, Қ. Баяқышова,
З. Ж. Тұрлыбаева, Л. А. Кошелева, О. Г. Чугай**

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы, Қазақстан

**ПОЛИЛАКТОБАК ПРОБИОТИГІНІҢ ҚҰРАМЫНА КІРЕТІН СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ
ЖӘНЕ ПРОПИОН ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАР ШТАМДАРЫНЫҢ ЛИЗОЦИМДІ
ЖӘНЕ АНТИИНТЕРФЕРОНДЫ БЕЛСЕНДІЛІГІ**

Аннотация. Екі қоректік ортасында MRS және ашытқы экстрактысы бар сүт сарысуында өсірілген сүт қышқылы мен пропион қышқылы бактериялар штамдарының лизоцимоздік және антиинтерферондық белсенділігі зерттелді. Белсенділігі сұйық культураларда және 7% сахароза + 10% қосылған сублимационды кептірілген ҚМС анықталған. Госпитальды инфекцияларды емдеуге арналған Полилактобак пробиотик құрамына кіретін сүт қышқылы (*Lactobacillus cellobiosus* 20, *Lactobacillus brevis* 139, *Lactobacillus plantarum* 14д) және пропион қышқылы (*Propionibacterium shermanii*-2/10) бактериялардың кептірілген және сұйық культуралары лизоцимді белсенділікке ие және антиинтерферондық белсенділігі жоқ (1:40 және 1:60 концентрациясында интерферонмен), бұл ұсынылған пробиотикалық препараттың емдік тиімділігін арттыратыны анықталған. Зерттеулердің нәтижелері пробиотикалық препараттардың биологиялық белсенділігі туралы түсініктерді дамытуға және әр түрлі аурулардың алдын алу мен емдеу үшін кеңінен қолдануға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: пробиотик, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, лизоцимдік белсенділігі, антиинтерферондық белсенділік.

Сведения об авторах:

Институт микробиологии и вирусологии

Лаборатория микробных препаратов

Ратникова Ирина Александровна – д.б.н., доцент, заведующая лабораторией микробных препаратов,

Гаврилова Нина Николаевна – д.б.н., профессор, внс лаборатории микробных препаратов

Баяқышова Куаныш Баяқышовна – к.б.н., снс лаборатории микробных препаратов

Тұрлыбаева Зере Жаиковна – нс лаборатории микробных препаратов

Кошелева Людмила Александровна – мнс лаборатории микробных препаратов