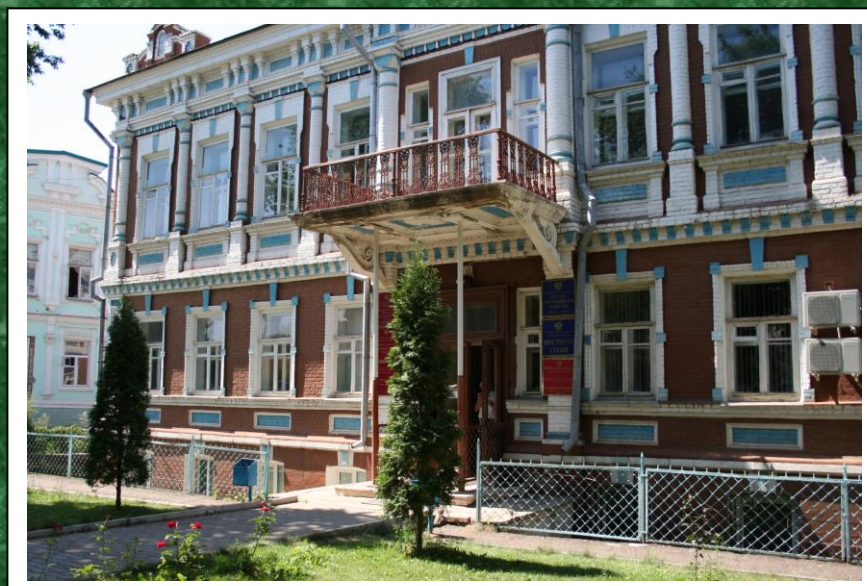


ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2012 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2012

УДК 579.61

О.В. Бухарин¹, Н.Б. Перунова¹, Е.В. Иванова^{1,2}

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* С ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ В МИКРОСИМБИОЦЕНОЗЕ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

² Оренбургская государственная медицинская академия Росздрава, Оренбург, Россия

Цель исследования: изучение влияния экзометаболитов *B. bifidum* на биологические свойства бактерий, представителей нормофлоры, и их способность взаимодействовать с ассоциативными микросимбионтами.

Материалы и методы: в исследованиях использованы штаммы бактерий, представителей нормальной микрофлоры кишечника человека: *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* лактозопозитивные негемолитические (lac «+»/hly «-»). В качестве условно-патогенных микроорганизмов использовали культуры *E. coli* лактозонегативные гемолитические (lac «-»/hly «+»), *K. pneumoniae* и *S. aureus*. Выделение и идентификацию микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами в соответствии с методическими рекомендациями. В первой серии экспериментов изучали влияние метаболитов *B. bifidum* на биологические свойства микроорганизмов, представителей нормофлоры. Во второй серии – влияние супернатантов бифидобактерий на взаимоотношения *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* lac «+»/hly «-» с условно-патогенными ассоциантами. Ростовые свойства (РС), образование биопленок (БПО) и антилизоцимную активность (АЛА) микроорганизмов исследовали фотометрическим способом. Измерения оптической плотности производили на фотометре ELx808 (BioTek, США). Полученные данные обработали непараметрическим методом с применением критерия Манна-Уитни.

Результаты: установлено, что супернатант *B. bifidum* в 33,3–66,7 % случаев стимулировал или не изменял рост/размножение, БПО и АЛА микроорганизмов, характерных для эубиоза кишечника, и, в том числе бактерий своего вида, что может иметь значение при реализации бифидобактериями колонизационной резистентности биотопа. Выявлены особенности взаимодействия экзометаболитов бифидобактерий с микроорганизмами, характерными для эубиоза кишечника человека, заключающиеся в усилении или смене эффектов влияния представителей нормофлоры на БПО ассоциантов. Максимальное усиление ингибирующего действия индигенных штаммов под воздействием бифидобактерий, отмечено в ассоциациях *E. coli* lac «+»/hly «-» и *E. coli* lac «-»/hly «+», а также *E. faecium* и *S. aureus*.

Заключение: таким образом, полученные данные возможно использовать для выявления механизмов функционирования нормального микросимбиоза при ассоциативном симбиозе человека.

Ключевые слова: бифидобактерии, усиление ингибирующего действия, представители нормальной микрофлоры, условно-патогенные микроорганизмы, ассоцианты, биоплёнкообразование.

O.V. Bukharin¹, N.B. Perunova¹, E.V. Ivanova^{1,2}

INTERACTION OF *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* WITH NORMAL MICROFLORA IN MIKROSymbiocENOSIS OF HUMAN GUT

¹ Institute of cellular and intracellular symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

² Orenburg state medical academy, Orenburg, Russia

Aim: study the effect of exometabolites of *B. bifidum* in the biological properties of bacteria, representatives of normal flora, and their ability to interact with associative microsymbionts.

Materials and methods: the study used strains of bacteria, representatives of normal microflora of the human gut: *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* and lactozopozitive and non-haemolyticus *E. coli* (lac «+» / hly «-»). As opportunistic pathogens using culture lactosonegative and haemolyticus *E. coli* (lac «-» / hly «»), *K. pneumoniae* and *S. aureus*. Isolation and identification of microorganisms was carried out by conventional methods in accordance with the guidelines. In the first series of experiments studied the effect of metabolites of *B. bifidum* in the biological properties of organisms, representatives of normal flora. In the second series - the influence of supernatants of bifidobacteria on the relationship between *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* and *E. coli* lac «+» / hly «-» to opportunistic associants. Growth Properties (GP), the biofilm formation (BFF) and antilysozyme activity (ALA) investigated photometrically. Measurements of the optical density produced on a photometer ELx808 (BioTek, USA). The obtained data are processed by using the nonparametric Mann-Whitney test.

Results: the supernatant of *B. bifidum* in the 33,3 – 66,7% of cases stimulated or did not change the growth/reproduction, BFF and ALA microorganisms specific to eubiosis of intestine, and, including its own species of bacteria that can make a difference in the implementation of bifidobacteria colonization resistance habitat was found. The features of the interaction of bifidobacteria with microorganisms exometabolites characteristic eubiosis human intestine, is to strengthen, or change of the effect of the representatives of normal flora in the BFF of associants. The maximum gain of the inhibitory action of indigenes strains under the influence of bifidobacteria observed in association *E. coli* lac «+» / hly «-» and *E. coli* lac «-» / hly «+», and *E. faecium* and *S. aureus*.

Conclusion: thus, the data can be used to identify the mechanisms of normal microsymbiocenosis associative symbiosis with humans.

Key words: bifidobacteria, increased the inhibitory effect, representatives of normal microflora, opportunistic microorganisms, associants, the biofilm formation.

Введение.

В качестве одного из примеров ассоциативного симбиоза человека с многовидовым микробным сообществом, являющимся основой его микроэкологической системы, может быть рассмотрен микросимбиоз дистального отдела толстого кишечника человека. Достаточно устойчивый кишечный микросимбиоз формируют доминантные (бифидобактерии) и ассоциативные микросимбионты с разнообразным содержанием входящих в них

представителей микрофлоры, определяя качественную и количественную характеристику микробного сообщества [4].

Важной функцией доминантной микрофлоры является ее участие в защите организма хозяина от колонизации биотопа патогенами [6]. Ранее, в наших работах с использованием в качестве модельной системы микросимбиоза кишечника было показано снижение антилизосимной активности и способности к образованию биопленок бактерий под действием экзометаболитов бифидофлоры [5]. Однако открытым остается вопрос об опосредованном влиянии *Bifidobacterium spp.* на биологические свойства условно-патогенных (патогенных) микроорганизмов, осуществляемом через модификацию бифидобактериями биологических свойств других представителей нормальной микрофлоры, находящихся с ними в едином микросимбиозе. Не исключено, что данные взаимодействия могут способствовать эффективному подавлению условно-патогенной (патогенной) микрофлоры и способствовать раскрытию механизмов формирования нормобиоценоза кишечника человека.

Цель исследования: изучение влияния экзометаболитов *B. bifidum* на биологические свойства бактерий, представителей нормофлоры, и их способность взаимодействовать с ассоциативными микросимбионтами.

Материалы и методы.

Исследования были проведены на модели штаммов микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры кишечника человека: *Bifidobacterium bifidum* (n=4), *Lactobacillus acidophilus* (n=4), *Enterococcus faecium* (n=4) и *Escherichia coli* лактозопозитивные негемолитические (lac «+»/hly «-») (n=4). В качестве условно-патогенных микросимбионтов (ассоциантов) использовали культуры *E. coli* лактозонегативные гемолитические (lac «-»/hly «+») (n=4), *Klebsiella pneumoniae* (n=4) и *Staphylococcus aureus* (n=4). Все исследованные штаммы микроорганизмов были изолированы от пациентов 18 - 45 лет при обследовании на дисбиоз кишечника. Выделение и идентификацию микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами в соответствии с методическими рекомендациями [6].

В первой серии опытов было изучено влияние экзометаболитов *B. bifidum* на биологические свойства (рост/размножение, биопленкообразование и антилизосимную активность) *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* (lac «+»/hly «-»). Изучение влияния супернатантов бифидобактерий на

биологические свойства микроорганизмов были проведены по описанной ранее методике [5].

Во второй серии экспериментов было изучено влияние *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* lac «+»/hly «-», соинкубированных с супернатантом *B. bifidum*, на биопленкообразование исследуемых штаммов *E. coli* lac «-»/hly «+», *K. pneumoniae* и *S. aureus*.

Для получения супернатантов (фильтратов) штаммы микроорганизмов культивировали в бульоне Schaedler (BBL, США) при 37⁰ С в течение 24 – 48 часов. Анаэробные микроорганизмы и микроаэрофилы инкубировали в анаэробной камере “GasPak 150” (BBL, США) с помощью газогенераторных пакетов “GasPak Anaerobic System” (BBL, США). Далее бульонные культуры центрифугировали (3000 об/мин 15 минут) и пропускали внклеточную жидкость через мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,2 мкм.

Культуры бифидобактерий, лактобацилл, энтерококков и негемолитических лактозопозитивных кишечных палочек соинкубировали с супернатантом *B. bifidum* в течение 2 часов при 37⁰, затем центрифугировали, ресуспендировали и культивировали в питательном бульоне в течение 24 часов при 37⁰. Полученные бульонные культуры микроорганизмов центрифугировали, получали фильтрат и соинкубировали с исследуемыми штаммами условно-патогенных ассоциантов (*E. coli* (lac «-»/hly «+»), *K. pneumoniae* и *S. aureus*, у которых определяли уровень биопленкообразования. Выраженность изменений биологических свойств микроорганизмов определяли как разницу между опытом и контролем в процентном отношении.

Ростовые свойства (РС), образование биопленок (БПО) и антилизоцимную активность микроорганизмов исследовали фотометрическим способом [1, 9]. Измерения оптической плотности производили на фотометре ELx808 (BioTek, США). Эксперименты были проведены в трёх дублях. Данные по определению регулирующего влияния экзометаболитов *B. bifidum* на биологические свойства микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры кишечника человека, и их способность ингибировать БПО условно-патогенных микросимбионтов были подвергнуты статистической обработке непараметрическим методом с применением критерия Манна-Уитни. Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при значении $p < 0,05$.

Результаты.

В первой серии экспериментов было установлено, что супернатанты *B. bifidum* преимущественно (в 83,7±5,3 % случаев) не оказывали влияние на рост/размножение исследуемых культур *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* lac «+»/hly «-». Стимуляция РС данных микроорганизмов, также как и ингибирование, выявлена не более чем в 8,3±5,3 % случаев.

Увеличение БПО под действием супернатанта *B. bifidum* было отмечено у всех изученных культур *B. bifidum* (на 25,1±2,5 % от исходного уровня признака) ($p<0,05$), 50±5 % исследуемых штаммов *E. faecium* (на 32±2,5 % по сравнению с контролем) ($p<0,05$) и *L. acidophilus* (на 13,9±2,3 % от исходного уровня признака) ($p<0,05$), а также у 33,3±4,7 % *E. coli* lac «+»/hly «-» (на 37,8±2,5 % от первоначальных значений) ($p<0,05$).

Экзометаболиты *B. bifidum* также стимулировали антилизоцимную активность (АЛА) *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* lac «+»/hly «-» в 66,7±8,3% случаев. Выраженность стимулирующего эффекта влияния бифидобактерий на АЛА *B. bifidum* составляла 23,1±2,5%, *L. acidophilus* – 13,7±1,9%, *E. coli* lac «+»/hly «-» - 32,1±3,2% и *E. faecium* - 18,4±2,0% ($p<0,05$). В 33,3-50,0 % случаев фильтрат бифидобактерий не изменял биопленкообразование и АЛА исследуемых видов бактерий.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, о том, что метаболиты *B. bifidum* в 50 % случаев и более стимулировали или не изменяли биологические свойства микроорганизмов, характерных для эубиоза кишечника, в том числе бактерий своего вида, что может иметь значение при реализации бифидобактериями колонизационной резистентности биотопа. Данные изменения были характерны для таких универсальных биологических свойств микроорганизмов, как биопленкообразование и антилизоцимная активность, способствующих выживанию (персистенции) и адаптации микросимбионтов в организме хозяина.

Известно, что включение микроорганизмов в состав микросимбиоценоза может приводить к изменению взаимоотношений микросимбионтов [3, 11], в связи с чем, на следующем этапе было изучено влияние *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* lac «+»/hly «-» на ассоцианты (под контролем изменения их БПО) под воздействием фильтратов *B. bifidum*.

При анализе результатов второй серии экспериментов было выявлено, что соинкубирование культур *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *E. faecium* и *E. coli* lac

«+»/hly «-» с экзометаболитами *B. bifidum* способствовало изменению взаимоотношений представителей нормальной микрофлоры с условно-патогенными ассоциантами (табл. 1). При этом чаще (в 62,5±6,9% случаев) отмечалось изменение выраженности первоначального ингибирующего эффекта влияния бифидобактерий, лактобацилл, эшерихий и энтерококков на БПО ассоциантов (в 50,0±7,2% случаев - увеличение, а в 12,5±4,6% – снижение) и реже (не более чем в 33,0±6,7% случаев) смена эффекта влияния со стимулирующего на индифферентный.

Таблица. 1. Влияние супернатанта *B. bifidum* на выраженность ингибирующего эффекта влияния представителей нормофлоры кишечника в отношении БПО условно-патогенной микрофлоры

Штаммы	<i>E. coli</i> lac «-»/hly «+» (n=4)		<i>K. pneumoniae</i> (n=4)		<i>S. aureus</i> (n=4)	
	Контроль, %	Опыт, %	Контроль, %	Опыт, %	Контроль, %	Опыт, %
<i>E. coli</i> lac «+»/hly «-» (n=4)	15±0,5	30±1,1* ↑	62±2,4	48±1,6* ↓	15±0,5	17±0,5
<i>E. faecium</i> (n=4)	15±0,5	16±0,5	56±2,4	63±2,1	15±0,5	53±2,2* ↑
<i>L. acidophilus</i> (n=4)	30±1,2	45±1,1* ↑	55±2,1	40±1,1* ↓	35±1,2	38±1,2
<i>B. bifidum</i> (n=4)	25±1,1	41±1,2* ↑	50±1,8	68±2,1* ↑	25±1,1	51±2,1* ↑

↓ - снижение ингибирующего эффекта ($p \leq 0,05$); ↑ - увеличение ингибирующего эффекта ($p \leq 0,05$); в % выражено изменение экспрессии БПО микроорганизмов при сравнении опытных и контрольных значений признака.

При влиянии метаболитов *B. bifidum* на исследуемые штаммы *E. coli* lac «+»/hly «-» происходило увеличению выраженности ингибирования БПО у культур *E. coli* lac «-»/hly «+» в 2 раза ($p < 0,05$) и *K. pneumoniae* в 1,3 раза ($p < 0,05$) в сравнении с контролем. Супернатант бифидобактерий не оказывал воздействие на взаимоотношения лактозопозитивных негемолитических эшерихий с культурами *S. aureus*.

Внесение супернатанта *B. bifidum* в среду культивирования *E. faecium* приводило к увеличению выраженности ингибирования БПО у *S. aureus* в 3,5 раза ($p < 0,05$). Эффекты влияния бифидобактерий, лактобацилл, эшерихий и энтерококков в отношении других видов ассоциантов под действием *B. bifidum* не изменялись.

Взаимодействие супернатанта *B. bifidum* с культурой *L. acidophilus* способствовало изменению воздействия лактобацилл с *E. coli* lac «-»/hly «+» (увеличение выраженности подавления БПО эшерихий в 1,5 раза; $p < 0,05$) и *K. pneumoniae* (снижение экспрессии ингибирования БПО клебсиелл в 1,4 раза; $p < 0,05$).

Соинкубирование метаболитов *B. bifidum* с культурой *B. bifidum* приводило к модификации взаимодействия бифидобактерий со всеми исследуемыми штаммами условно-патогенных микросимбионтов. При этом выраженность ингибирующего влияния бифидобактерий на БПО штаммов *E. coli* lac «-»/hly «+» возросла в 1,6 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$), *K. pneumoniae* в 1,4 раза ($p < 0,05$) и *S. aureus* в 2 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, выявлены особенности взаимодействия экзометаболитов бифидобактерий с микроорганизмами, характерными для эубиоза кишечника человека, заключающиеся в усилении, появлении или смене эффектов влияния представителей нормофлоры на ассоциантов. По-видимому, супернатант бифидобактерий, способен потенцировать защитное действие других представителей микросимбиоценоза против условно-патогенной ассоциативной микрофлоры, что может быть одним из механизмов функционирования микросимбиоценоза при эубиозе кишечника человека. Максимальное усиление экспрессии ингибирующего действия индигенных штаммов под воздействием бифидобактерий, отмечено в ассоциациях внутри вида, где микроорганизмы различались по биохимическим и биологическим свойствам (*E. coli* lac «+»/hly «-» и *E. coli* lac «-»/hly «+»), а также при взаимодействии грампозитивных кокков (*E. faecium* и *S. aureus*).

Заключение.

В микросимбиоценозе кишечника человека ведущая роль в регуляции межмикробных взаимоотношений принадлежит бифидобактериям, которые проявляют не только антагонистическую активность в отношении условно-патогенной транзитной микрофлоры, но и образуют ассоциации с другими видами микросимбионтов – представителями нормальной микрофлоры. В

данных ассоциациях выявлен синергидный тип межвидовых взаимосвязей симбионтов, способствующий взаимному усилению биологических свойств микроорганизмов [5]. Проведенные исследования показали, что при взаимодействии компонентов бифидобактерий с культурами бифидобактерий, лактобацилл, энтерококков и лактозопозитивных негемолитических кишечных палочек имеет место как модификация изучаемых биологических свойств, способствующая выживанию этих бактерий в организме человека в условиях эубиоза, так и стимуляция способности нормофлоры ингибировать биопленкообразование условно-патогенных ассоциативных микросимбионтов при дисбиозе.

Известно, что бифидобактерии воздействуя на представителей индигенной микрофлоры, стимулируют их рост за счет продукции витаминов и других ростстимулирующих факторов, уменьшения рН, нейтрализации токсинов [8]. Однако проведенные исследования по предварительному кратковременному соинкубированию супернатантов бифидобактерий с микроорганизмами не выявили усиления ростовых свойств исследуемых штаммов *E. faecium*, *E. coli* lac «+»/hly «-», *B. bifidum* и *L. acidophilus*, что позволяет предположить существование других механизмов их взаимодействия, в том числе реализуемых при участии сигнальных молекул (феромонов, гомосеринлактонов и др.) [10] или контакт-зависимых [7] сенсорных систем бактерий, играющих важную роль в адаптации микроорганизмов к изменяющимся условиям окружающей среды. Не исключено, что активация внутриклеточных каскадных реакций способствует изменению метаболической активности микробных клеток нормальной микрофлоры, оказывая влияние на рост и физиологические функции условно-патогенных (патогенных) ассоциативных микроорганизмов.

Таким образом, полученные данные можно использовать для выявления механизмов функционирования нормального микросимбиоза при ассоциативном симбиозе человека.

(Работа выполнена по программе Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» в рамках проекта № 12-П-4-1015 «Инфектологические механизмы ассоциативного симбиоза человека» и программе Президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций в рамках проекта № 12-П-4-1045 «Изучение интеграционных механизмов межмикробных взаимоотношений микросимбионтов кишечной микробиоты человека»).

Литература.

1. Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий. М.-Медицина; Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 365 с.
2. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург, УрО РАН, 2007.
3. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В. Способ определения способности микроорганизмов регулировать антагонистическую активность бактерий. Патент РФ № 2376381 от 20.12.2009; Б.и. № 35. 2009.
4. Несвижский Ю.В., Воробьев А.А., Белонос С.С. и др. Анализ простых межмикробных взаимоотношений в микробиоценозе толстой кишки человека. // Вестник РАМН, 1997. № 3. С. 23 -26.
5. Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Бухарин О.В. Микробная регуляция биологических свойств бактерий кишечного микросимбиоза человека // Журн. микробиол. 2010, 6: 76 — 80.
6. Приказ Минздрава России от 09.06.2003г. №231 Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003).
7. Blango M.G. and Mulvey M.A. Bacterial Landlines: Contact-dependent Signaling in Bacterial Populations // Curr Opin Microbiol., 2009, 12(2): 177–181.
8. Cheikhoussef A., Pogori N., Chen H., Zhang H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. // International Journal of Food Microbiology. 2008, 12: 215–222.
9. O'Toole G.A., Kaplan A.H., Kotler R. Biofilm formation as microbial development // Ann. Rev. Microbiol. 2000, 4: 49-76.
10. Skerker J.M., Perchuk B., Goulian M., Laub M.T. Rewiring the Specificity of Two Systems // Cell. 2008, 133(6): 1043–1054.
11. Shank A. E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling // Curr. Opin. Microbiol., 2009. V. 12, No. 2. P. 205 – 214.

Поступила 23.09.2012

(Контактная информация: Перунова Наталья Борисовна – ведущий научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. 8 (3532) 775417; e-mail: perunovanb@gmail.com)