

ISSN 2304-9081

Учредители:  
Уральское отделение РАН  
Оренбургский научный центр УрО РАН

**Бюллетень**  
**Оренбургского научного центра**  
**УрО РАН**  
(электронный журнал)



**2014 \* № 3**

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

© Коллектив авторов, 2014

УДК 579.61

*А.В. Салгина, Е.В. Иванова, Т.А. Бондаренко, Н.Б. Перунова*

## **АНТИЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ В АССОЦИИ ОБЛИГАТНО-АНАЭРОБНЫХ МИКРОСИМБИОНТОВ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА**

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

*Цель исследования:* оценить изменения антилизоцимной активности в ассоциации облигатно-анаэробных бактерий.

*Материалы и методы:* Выделение и идентификация анаэробных микроорганизмов проводилась в соответствии с руководством. Видовую идентификацию бактерий осуществляли с помощью MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Исследование антилизоцимной активности (АЛА) [14] облигатно-анаэробных микроорганизмов в условиях межмикробных взаимодействий проводили при добавлении стерильных супернатантов (продуктов жизнедеятельности) в питательный бульон. Данные исследования статистически обработаны с использованием непараметрических методов вариационной статистики [15].

*Результаты:* Изменение АЛА в ассоциации облигатных анаэробов позволило предположить наличие два основных типа связи между микросимбионтами: синергидного и антагонистического.

*Заключение:* Полученные данные расширяют представления о механизмах межмикробных взаимоотношений, основанных на изменении АЛА облигатно-анаэробных микросимбионтов в микросимбиозе кишечника при ассоциативном симбиозе человека.

*Ключевые слова:* облигатно-анаэробные микроорганизмы, межмикробные взаимодействия, антилизоцимная активность.

---

---

*A.V. Salgina, E.V. Ivanova, T.A. Bondarenko, N.B. Perunova*

## **ANTILYSOZYME ACTIVITY ASSOCIATION OBLIGATE ANAEROBIC MICRO-SYMBIONTS HUMAN INTESTINAL**

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, UrB RAS, Orenburg, Russia

*Aim:* To evaluate the changes of anti-lysozyme activity of obligate anaerobic bacteria in their interaction in the association.

*Materials and Methods:* Isolation and identification of anaerobic microorganisms was carried out in accordance with the instruction. Identification of bacterial species was carried out by MALDI TOF MS. Antilysozyme activity (ALA) of obligate anaerobes in terms of cross-species interactions were performed by adding sterile supernatants (waste products) in nutrient broth. These studies are statistically processed using nonparametric methods.

*Results:* Change in ALA association obligate anaerobes suggesting the presence of two main types of communication between mikrosibionts: synergistic and antagonistic.

*Conclusion:* The data obtained are expanding understanding of the mechanisms of cross-species interaction based on the change in ALA obligate anaerobic microsymbionts mikrosymbiocenosis in the intestine in human associative symbiosis.

*Key words:* obligately anaerobic organisms, cross-species interaction, antilysozyme activity.

## **Введение**

В настоящее время благодаря современным методам молекулярно-генетических исследований значительно расширились представления относительно видового состава микробиоты человека, однако неизменным остается тот факт, что облигатно-анаэробные бактерии составляют преобладающую по численности группу в биотопе дистального отдела толстого кишечника [1-3]. Не исключено, что высокая численность облигатно-анаэробной микробиоты обусловлена их важной ролью для организма хозяина: обеспечение колонизационной резистентности, участие в деградации токсинов, ферментов агрессии и защиты патогенных микроорганизмов, продукция витаминов, участие в метаболических и ферментативных процессах и др. [4, 5].

Известно, что при сосуществовании микроорганизмов в биотопе между ними формируются различные взаимоотношения – конкурентные или кооперативные, благодаря которым образуется специфический микросимбиоз [6]. Исследованию механизмов межмикробных взаимоотношений между различными видами облигатных анаэробов посвящено ряд работ. Так, S. Vartosh et al. [7] и F.E. Rey et al. [8] установили, что сокультивирование штаммов *Bifidobacterium bifidum* и *B. lactis* приводит к увеличению их роста, а *Bacteroides thetaiotaomicron* стимулировал рост *B. hydrogenotrophica*. Кроме того, в ассоциации облигатно-анаэробных бактерий происходит обмен генетическим материалом, как это показано на примере *Bacteroides spp.* и *Clostridium spp.* [9]. Формирование синергидных связей при совместной утилизации питательных субстратов выявлено на моделях *B. longum/B. thetaiotaomicron*; *Bacteroides spp. /Clostridium spp.*; *B. adolescentis/Roseburia spp.* и *B. adolescentis/E. rectale* [10-12].

Очевидно, что при рассмотрении межмикробных взаимоотношений с позиции ассоциативного симбиоза, включающего не только микросимбионтов, но и хозяина с его защитно-регуляторными системами, необходимо учитывать персистентный потенциал микробиоты. В частности, антилизоцимная активность было определена как «биомишень», посредством которой оценивали характер межмикробных взаимоотношений при ассоциативном симбиозе человека [13].

Однако в настоящее время данные об изменении антилизоцимной активности в ассоциации облигатно-анаэробных бактерий отсутствуют, что и определило цель нашей работы.

Цель работы – оценка изменения антилизоцимной активности облигатно-анаэробных бактерий при их взаимодействии.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили 35 штаммов облигатно-анаэробных бактерий родов *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*. Выделение и идентификация анаэробных микроорганизмов проводилась в соответствии с руководством «Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual» (2002) общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных и культуральных свойств. Видовую идентификацию бактерий осуществляли по прямому белковому профилированию с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с использованием масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT с программным обеспечением Maldi BioTyper 3,0 (Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию микроорганизмов с расчетом коэффициента достоверности (Score) проводили с использованием программного обеспечения Maldi BioTyper 3,0.

Для выявления антилизоцимной активности (АЛА) бактерий использовали фотометрический метод О.В. Бухарина с соавт. [14]. Облигатно-анаэробные микроорганизмы культивировали в жидкой питательной среде Schaedler (BBL, США) в анаэробном термостате (Binder, Германия) при 37<sup>0</sup>С в течение 48 часов. Затем проводили измерение оптической плотности (OD) бульонной культуры против бульона (Y) на фотометре Elx808 (BioТек, США), длина волны 450 нм. Супернатант отделяли от микробных клеток центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 минут.

В качестве тест-штамма для определения АЛА использовали ацетонированную агаровую культуру *Micrococcus luteus* ATCC 15307. Культуру ресуспензировали в физиологическом растворе, доводили оптическую плотность (ОП) тест-штамма до 0,30 (0,28-0,32).

На 1/15М фосфатном буфере (рН=6,2) готовили раствор лизоцима с концентрацией 20 мкг/мл.

Супернатант исследуемых микроорганизмов объёмом 0,9 мл смешивали с 0,1 мл приготовленного раствора лизоцима и инкубировали 60-120 мин при 37<sup>0</sup>С. Затем 50 мкл смеси супернатанта с лизоцимом помещали в полистеролловый планшет по вертикальным рядам. Верхняя и нижняя лунки -

контроли: смесь питательного бульона и лизоцима. В лунки каждого ряда планшета вносили по 200 мкл суспензии микрококка многоканальной пипеткой. Замер оптической плотности проводили через 30 и 150 сек. после внесения в лунки микрококка.

По степени лизиса суспензии тест-штамма рассчитывали антилизоцимную активность исследуемой культуры по формуле:

$$A = \frac{V1 * C * (1 - \Delta D0 / \Delta Dk)}{V2 * Y}, \text{ где}$$

A - антилизоцимная активность в микрограммах инактивированного лизоцима/мл супернатанта.

V1 - объём (0,1 мл) раствора лизоцима исходной концентрации (20 мкг/мл).

V2 - объём (0,9 мл) супернатанта бульонной культуры исследуемого штамма.

C - исходная концентрация лизоцима (20 мкг/мл).

Y – оптическая плотность бульонной культуры исследуемого штамма, ед. оптической плотности.

$\Delta D0$  – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в опыте между 30 и 150 секунд.

$\Delta Dk$  - изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в контроле между 30 и 150 секунд.

Антилизоцимную активность выражали в мкг/мл\*OD.

Данные исследования статистически обработаны с использованием непараметрических методов [15].

### **Результаты и обсуждение**

Супернатанты *Bifidobacterium spp.* увеличивали АЛА у 75,0±1,2% штаммов бактероидов (с 0,9±0,01 до 1,55 мкг/мл\*OD) и пропионибактерий (с 0,8±0,01 до 1,9±0,01 мкг/мл\*OD), у 55,0±1,8% штаммов бифидобактерий (с 0,9±0,02 до 1,55 мкг/мл\*OD) и эубактерий (с 1,0±0,02 до 1,6 мкг/мл\*OD). Снижение АЛА отмечалось у 17,0±1,0 % клостридий (с 0,8±0,01 до 0,1±0,01 мкг/мл\*OD).

При изучении влияния супернатантов *Bacteroides spp.* на АЛА наблюдалось увеличение данного свойства у 87,0±2,0% бифидобактерий (с 0,99±0,02 до 1,5±0,01 мкг/мл\*OD), у 75±1,4% пропионибактерий (с 1,2±0,01

до  $1,6 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD) и у  $65 \pm 2,3\%$  эубактерий (с  $1,1 \pm 0,03$  до  $1,7 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD). Снижение АЛА отмечалось у  $21,0 \pm 2,0\%$  бактериоидов (с  $0,95 \pm 0,01$  до  $0,1 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD).

При изучении влияния супернатантов *Propionibacterium spp.* на АЛА облигатных анаэробов отмечалось увеличение свойства у  $68,0 \pm 1,5\%$  эубактерий (с  $1,1 \pm 0,02$  до  $1,4 \pm 0,02$  мкг/мл\*OD), у  $50 \pm 1,5\%$  штаммов бифидобактерий (с  $0,95 \pm 0,01$  до  $1,55 \pm$  мкг/мл\*OD) и пропионибактерий (с  $1,3 \pm 0,01$  до  $1,55 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD), а также бактериоидов (с  $0,9 \pm 0,02$  до  $1,72 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD). Ингибирующий эффект встречался у  $50,0 \pm 4,0\%$  клостридий (с  $0,8 \pm 0,03$  до  $1,62 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD) и  $33,0 \pm 2,8\%$  бактериоидов.

Супернатанты эубактерий увеличивали АЛА у  $90,0 \pm 2,8\%$  эубактерий (с  $1,1 \pm 0,03$  до  $1,62 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD), у  $78,0 \pm 1,8\%$  бифидобактерий (с  $0,9 \pm 0,1$  до  $1,62 \pm 0,2$  мкг/мл\*OD) и у  $65,0 \pm 1,4\%$  пропионибактерий (с  $1,2 \pm 0,2$  до  $1,7 \pm 0,1$  мкг/мл\*OD). Ингибирующий эффект наблюдался у  $50,0 \pm 1,9\%$  клостридий (с  $0,8 \pm 0,1$  до  $1,62 \pm 0,1$  мкг/мл\*OD) и у  $33,0 \pm 1,4\%$  бактериоидов (с  $0,9 \pm 0,1$  до  $1,62 \pm 0,01$  мкг/мл\*OD).

При изучении влияния супернатантов клостридий на АЛА регистрировалось увеличение свойства у  $77,0 \pm 2,7\%$  бифидобактерий (с  $0,9 \pm 0,1$  до  $1,5 \pm 0,1$  мкг/мл\*OD) и у  $87,0 \pm 4,2\%$  клостридий (с  $0,8 \pm 0,1$  до  $1,62 \pm 0,1$  мкг/мл\*OD). Снижение АЛА наблюдалось у  $67,0 \pm 1,8\%$  эубактерий (с  $1,0 \pm 0,1$  до  $1,5 \pm 0,1$  мкг/мл\*OD), у  $33,0 \pm 1,2\%$  бактериоидов (с  $0,9 \pm 0,1$  до  $1,62 \pm 0,1$  мкг/мл\*OD) и у  $25,0 \pm 1,0\%$  штаммов пропионибактерий (с  $1,2 \pm 0,1$  до  $2,0 \pm 0,1$  мкг/мл\*OD).

Анализ полученных результатов можно представить в виде схемы (рис.). На рисунке видно, что по изменению АЛА в ассоциации облигатных анаэробов можно предположить наличие двух типов связей между микросимбионтами: синергидного и антагонистического. Синергидная связь формировалась в ассоциации *Bifidobacterium spp./Bifidobacterium spp.*; *Bifidobacterium spp./Bacteroides spp.*; *Propionibacterium spp./Eubacterium spp.*; *Eubacterium spp./Eubacterium spp.*; *Eubacterium spp./Bifidobacterium spp.*, в которых происходило увеличение АЛА анаэробных бактерий под действием супернатантов микросимбионтов. Антагонистический тип был характерен для *Propionibacterium spp./Clostridium spp.* и *Eubacterium spp./Clostridium spp.*, при этом в

ассоциации бактерий отмечалось снижение АЛА микросимбионтов.

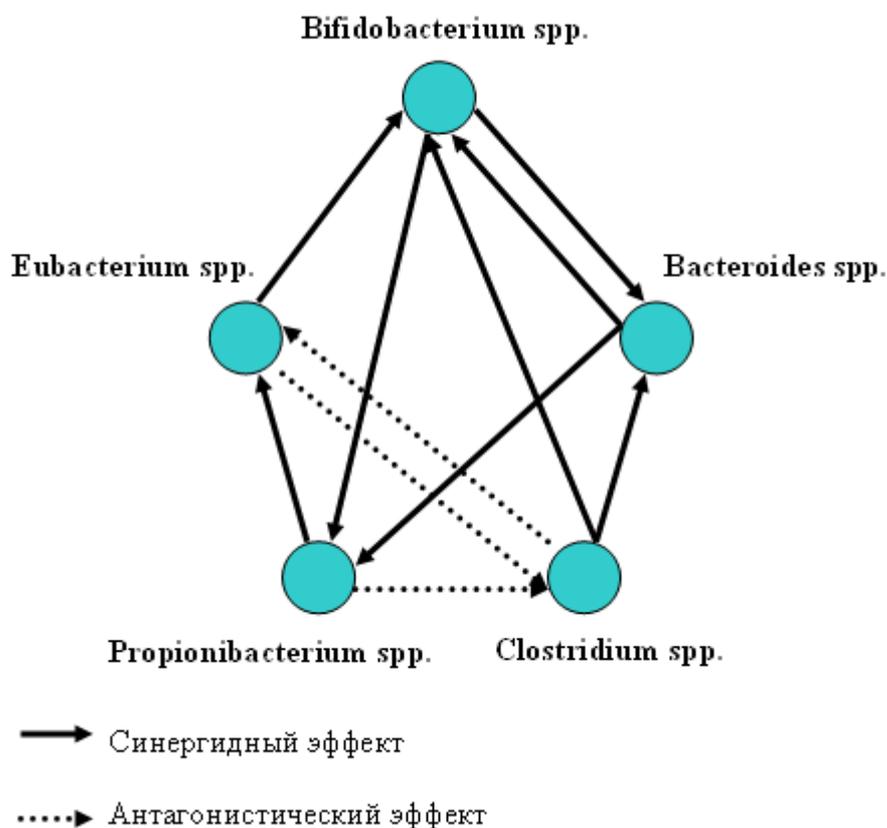


Рис. Типы взаимодействий между облигатно-анаэробными бактериями кишечника человека в отношении антилизосимной активности.

### **Заключение**

Формирование микрофлоры регулируется сложной системой межмикробных взаимодействий и макроорганизмом в процессе его жизни [16].

Полученные данные расширяют представления о механизмах межмикробных взаимоотношений, основанных на изменении АЛА облигатно-анаэробных микросимбионтов в микросимбиозе кишечника при ассоциативном симбиозе человека.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Шестаков С.В. Метагеномика микробиома человека. Усп. соврем. биологии 2010. 30 (6): 531–543.
2. Duerden B.I. The isolation and identification of Bacteroides spp from the normal human faecal flora. J.Med.Microbiol. 1980. 13: 69-78.
3. Borriello S.P. Bacteria and Gastrointestinal Secretion and Motility. Scand. J. Gastroenterology. 1984. 93: 92-94.
4. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. М.: ГРАНТЬ, 1998. Т 1: 288 .
5. Ley R.E., Peterson D.A. et al. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell. 2006. 124: 837-848.
6. Симбиоз и его роль в инфекции / Под ред. О.В. Бухарина. Екатеринбург: УрО РАН,

2011. 300.
7. Bartosch S., Woodmansey E.J., Paterson J.C.M. et al. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis*. 2005. 147: 238
  8. Rey F.E, Faith J.J., Bain J. et al. Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. *The Journal of biological chemistry*. 2010. 67: 210
  9. Shoemaker, N. B., Vlamakis H., Hayes K., Salyers A.A. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001. 74: 150.
  10. Sonnenburg J.L. et al. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*. 2005. 49: 17-26.
  11. Scott K.P., Martin J.C., Chassard C. et al. Substrate-driven gene expression in *Roseburia inulinivorans*: importance of inducible enzymes in the utilization of inulin and starch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. 79: 145.
  12. Belenguer A. et al. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006. 72: 72-79.
  13. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Симбиотические взаимоотношения человека и микроорганизмов. *Физиология человека*. 2012. 38 (1): 128-138.
  14. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина. 1999. 365 с.
  15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 1999. 459 с.
  16. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Микрофлора и здоровье человека. К.: ТОВ «Червона Рута-Турс». 2008. 552 с.

*Поступила 1.08.2014*

*(Контактная информация: Салгина Анастасия Владимировна – аспирант Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460052, г. Оренбург, ул. Салмышская 10, кв. 55; 8(922)-896-41-49;*

*Иванова Елена Валерьевна – к.м.н., ведущий научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН 460052, г. Оренбург, ул. Джангильдина 15, кв. 126; 8(961)-929-18-72;*

*Бондаренко Таисия Александровна – научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН 460026, г. Оренбург, ул. Карагандинская 86, кв. 36; 8(922)-816-73-01;*

*Перунова Наталья Борисовна – д.м.н., заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. 8(3532)775908; e-mail: [perunovanb@gmail.com](mailto:perunovanb@gmail.com))*