

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 579.22

О.И. Сидорова, Е.В. Иванова, Н.Б. Перунова.

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ИСТОЧНИКОВ ПИТАНИЯ НА АНТИЛИЗОЦИМНУЮ АКТИВНОСТЬ И БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Оценить характер влияния дефицита источников питания на базовые физиологические функции (антилизоцимная активность и биопленкообразование) бифидобактерий.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 5 штаммов *Bifidobacterium bifidum* изолированных от условно здоровых лиц в возрасте от 18 до 60 лет при обследовании на дисбиоз кишечника. Выделение и идентификацию бактерий осуществляли общепринятыми методами. Дефицит источников питания исследовали по методике Голод Н.А. с соавт. (2009), где данные условия являлись стрессовыми для культуры бифидобактерий. Антилизоцимную активность определяли по методике Бухарина О.В. с соавт. (1999) фотометрическим методом, биопленкообразование - по G. O'Toole (2000). Полученные данные обработаны непараметрическим методом вариационной статистики с применением критерия Манна-Уитни.

Результаты. Дефицит источников питания приводил к преимущественному снижению биопленкообразования и увеличению антилизоцимной активности исследуемых штаммов *B. bifidum*.

Заключение. Полученные в настоящей работе результаты расширяют представление об изменении биологических свойств бифидобактерий в ответ на стрессорные воздействия.

Ключевые слова: *Bifidobacterium bifidum*, антилизоцимная активность, биопленкообразование, дефицит источников питания.

O.I. Sidorova, E.V. Ivanova, N.B. Perunova

THE EFFECT OF STARVATION STRESS ON ANTILYSOZYME ACTIVITY AND BIOFILM FORMATION OF BIFIDOBACTERIA

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

Arm. Evaluate the nature of the influence of starvation stress on the basic physiological functions (anti-lysozyme activity and biofilm formation) bifidobacteria.

Materials and methods. The material for the study were 5 strains of *Bifidobacterium bifidum* isolated from apparently healthy individuals aged 18 to 60 years at screening for intestinal dysbiosis. Isolation and identification of bacteria was carried out by conventional methods. As stress model were selected and studied the starvation stress by method of Golod N.A. et al. (2009). Antilysozyme activity was determined according to Bukharin O.V. et al. (1999) photometrically, biofilm formation was determined by the method of G. O'Toole (2000). The obtained data were treated non-parametric method using the Mann -Whitney test.

Results. The starvation stress has led to the decrease of the ability to form biofilms and to the increase of anti-lysozyme activity of bacteria.

Conclusions. The results obtained in the present study extends understanding of the adaptive response to stress influences bifidobacteria.

Key words: *Bifidobacterium bifidum*, antilysozyme activity, biofilm, starvation stress.

Введение

Бифидобактерии – представители нормальной микробиоты пищеварительного тракта человека, являющиеся доминантными микросимбионтами при ассоциативном симбиозе человека и оказывающие влияние как на гомеостаз хозяина [1], так и на формирование количественного и качественного состава микросимбиоза кишечника. Определение влияния стрессовых факторов на бифидобактерии представляет интерес в следующих аспектах: во-первых, при изучении механизмов формирования ассоциативного симбиоза человека, где бифидобактерии подвергаются воздействию физико-химическими факторами и антимикробными веществами [2, 3], во-вторых, в изучении технологии производства пробиотиков, где бифидобактерии также могут находиться под стрессорным воздействием нагревания, охлаждения, осмотического шока, присутствия кислорода и др. [4], и, в-третьих, с позиции общей теории стресса, где внимание исследователей направлено на изучение способности микроорганизмов переживать неблагоприятные условия.

В настоящее время известно, что адаптационный ответ бифидобактерий может реализовываться посредством белков теплового шока, объединяющими в себя молекулярные шапероны, белки связанные с ДНК и синтезом РНК, а так же клеточным делением [5]. Наряду с этим, изучается ответная реакция на стрессорное воздействие, запрограммированное в онтогенезе бактериальной клетки, – истощение источников питания, которое приводит к формированию цистоподобных покоящихся клеток, или/и реализуется во внутривидовой вариативности молочнокислых бактерий [6]. В ряде работ, на модели бифидобактерий, изучен молекулярный ответ на стрессорное воздействие, где показана взаимосвязь между экспрессией SOS-генов и толерантностью к неблагоприятным условиям [2, 3, 5]. В то же время данные об изменении биологических свойств бифидобактерий под воздействием стрессовых факторов единичны.

В связи с этим целью исследования явилась оценка характера влияния стрессовых факторов на базовые физиологические функции (антилизоцимная активность и биопленкообразование) бифидобактерий.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 5 штаммов *Bifidobacterium bifidum*, изолированных от условно здоровых лиц в возрасте от 18 до 60 лет.

Выделение анаэробных микроорганизмов проводилось согласно руководству [7], а их видовую идентификацию осуществляли по прямому белковому профилированию с помощью времяпролетной масс-спектрометрии MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия).

В экспериментах *in vitro* дефицит источников питания исследовали по методике Н.А. Голод с соавт. [6]. Исчерпание источников питания достигали путем модификации питательной среды Шедлер бульон, где осуществляли культивирование бактерий в среде со сниженным в 5 раз содержанием глюкозы, либо переносили клетки в голодную среду без глюкозы.

Образование биопленок (БПО) оценивали по способности штаммов бифидобактерий к адгезии на поверхности 96-луночной полистироловой поверхности стерильного планшета [8]. Антилизозимная активность (АЛА) бифидобактерий определялась по методике О.В. Бухарина с соавт. [9].

Данные, полученные в результате исследования, были статистически обработаны непараметрическими методами вариационной статистики в компьютерной оболочке Windows с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel 2003 и программы «Биостат» с применением критерия Манна-Уитни. [10].

Результаты и обсуждение

Установлено, что при дефиците источников питания происходило снижение биопленкообразования у *B. bifidum* в $60,0 \pm 15,5\%$ случаев (рис.).

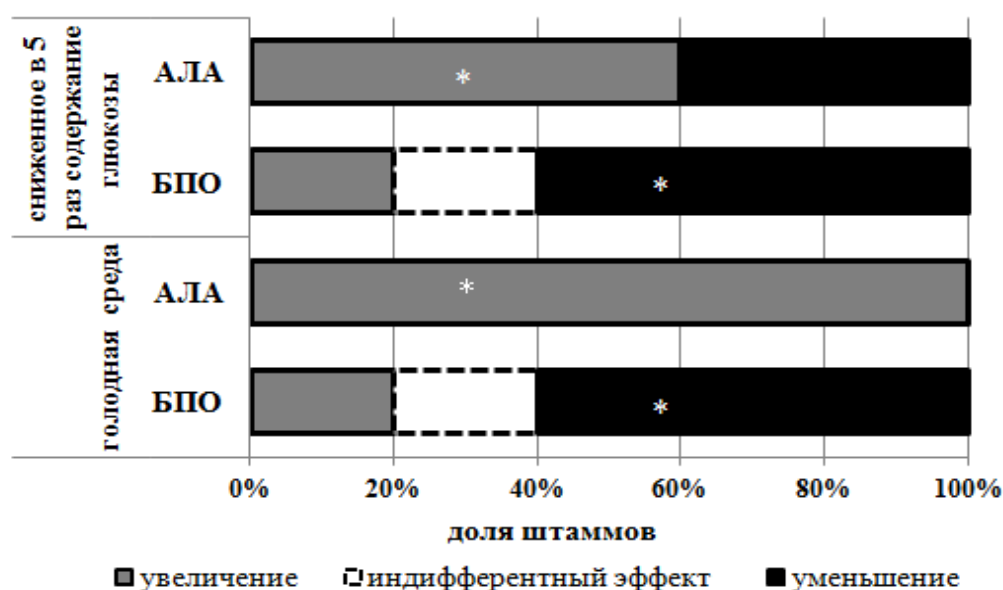


Рис. Пенетрантность антилизозимной активности и биопленкообразования *Bifidobacterium bifidum* при дефиците источников питания (*, $p < 0,05$).

Так, в случае сниженного в 5 раз содержания глюкозы в питательной среде значение БПО уменьшилось с $3,8 \pm 1,1$ ед. до $1,9 \pm 0,5$ ед., а при исключении из питательной среды источников углерода – до $1,34 \pm 0,09$ ед.

В то же время у $20,0 \pm 8,3\%$ исследуемых штаммов отмечалось увеличение БПО при исчерпании источников углерода, а при тех же условиях способность бифидобактерий образовывать биопленки в $20,0 \pm 8,3\%$ случаев не изменялась.

При изучении антилизоцимной активности бифидобактерий в условиях дефицита источников питания наблюдалась иная картина (рис.). При культивировании бифидобактерий в среде со сниженным в 5 раз содержанием глюкозы происходило увеличение АЛА в $60,0 \pm 15,5\%$ случаев с $0,37 \pm 0,07$ мкг/мл*ОП до $0,56 \pm 0,10$ мкг/мл*ОП, а у $40,0 \pm 15,5\%$ исследуемых штаммов отмечалось ингибирование АЛА до $0,14 \pm 0,09$ мкг/мл*ОП. В случае, когда бифидобактерии переносили в питательную среду без глюкозы, увеличение антилизоцимного признака происходило у всех исследуемых штаммов и показатель АЛА достигал уровня $1,47 \pm 0,30$ мкг/мл*ОП, что почти в 4 раза превышает значение данного свойства при культивировании в сбалансированной питательной среде.

Заключение.

Таким образом, полученные в исследованиях *in vitro* данные позволили установить, что адаптивный ответ бифидобактерий в условиях дефицита источников питания выразался в преимущественном снижении способности *B. bifidum* образовывать биопленки и увеличении антилизоцимной активности. Выбор данных биологических свойств в нашей работе не случаен. В последнее время, антилизоцимный признак широко используется в ряде экспериментальных и клинических работ [11-13], где АЛА выбрана в качестве «биомишени» межмикробных взаимоотношений в ассоциациях; в исследованиях механизма действия различных препаратов – антибиотиков, гормонов и др. В работе О.В. Бухарина и Н.Б. Перуновой [11] АЛА и БПО выделены в системообразующий фактор микросимбиоза, обеспечивающий выживание микросимбионтов при ассоциативном симбиозе человека. Так же отмечается способность биопленок защищать населяющие их микроорганизмы от последствий вредных воздействий окружающей среды [14]. Известно, что при воздействии стрессовых условий происходит изменение физиологического

состояния микроорганизмов, что приводит к секреции метаболитов, способствующих адаптации к неблагоприятным условиям роста, и одними из таких адаптогенов являются алкилоксибензолы (АОБ), которые обладают, в том числе, свойствами химических шаперонов [15]. АОБ относят к метаболитам бактериального происхождения, способных оказывать на функциональную активность лизоцима выраженное ингибирующее действие [16], что, возможно, приводит к увеличению антилизоцимной активности в стрессовых условиях. На процесс формирования биоплёнок и их свойства влияют факторы окружающей среды и макроорганизма, где наиболее важными из них являются физико-химические свойства (рН, температура, осмолярность и т.д.), наличие питательных веществ, межклеточная коммуникация посредством специфических ауторегуляторов и др. [14]. С другой стороны, обсуждается характер изменения БПО микроорганизмов под действием различных видов стресса. Так, неоптимальные значения рН ингибируют образование биопленок *Staphylococcus epidermidis* [17], в то же время максимум адгезии *S. epidermidis* наблюдается при высоких значениях температуры, совсем не совместимых с ростом данных микроорганизмов, и ей способствует повышенная осмолярность среды [14]. Снижение биопленкообразования бифидобактерий при стрессорных воздействиях, возможно, связано с ингибированием адгезивной способности бактерий, что является ключевым моментом в образовании биопленки.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты расширяют представление об изменении биологических свойств бифидобактерий в ответ на стрессорные воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мальцева Н.Н., Шкарупета М.М., Пинегин Б.В. и др. Иммуномодулирующие свойства некоторых микробов – представителей нормальной микрофлоры кишечника. Антибиотики и химиотерапия. 1992. 37 (12): 41-43.
2. Ruiz L., Rus-Madiedo P., Gueimonde M. et al. How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. Genes Nutr. 2011. 6: 307-318.
3. Ventura M., Margolles A., Turrioni F. et al. Stress responses of bifidobacteria. Tsakalidou E. and Paradimitriou K., eds. Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. Springer US, 2011: 323-347.
4. Несчисляев В.А., Молохова Е.И., Демешева М.И. Способ получения сухой лиофилизированной биомассы лакто - и бифидобактерий. Патент РФ 2272837. Бюл., 2006. №9.
5. Schmidt G., Zink R. Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis* and *B. breve*. International Journal of Food Microbiology. 2000.

- 55: 41-45.
6. Голод Н.А., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л. и др. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям. Микробиология. 2009. 78 (3): 317-335.
 7. Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual. Washington. 2002.
 8. O'Toole G., Kaplan H., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000. 54: 49–79.
 9. Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 366с.
 10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459с.
 11. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014. 260с.
 12. Николаев Ю.А., Плакунов В.И. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? Микробиология. 2007. 76 (2):149-163.
 13. Фадеев С.Б., Чернова О.Л., Матюшина С.Б. Способ прогнозирования неблагоприятного течения гнойно-воспалительного заболевания микробной этиологии. Патент РФ 2143691. 1999.
 14. Кириллов Д.А., Вальшев А.В, Прусс В.Ф. и др. Оценка влияния лекарственных препаратов на биологические свойства *C. difficile*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003, 4: 85-88.
 15. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. и др. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367с.
 16. Петровский А.С., Дерябин Д.Г., Лойко Н.Г. и др. Регуляция алкилоксибензолами функциональной активности лизоцима. Микробиология. 2009. 78 (2): 176-185.
 17. Коробов В.П., Лемкина Л.М, Монахов В.И. Анализ чувствительности процессов формирования биопленок *Staphylococcus epidermidis* 33 к некоторым факторам внешней среды. Вестник пермского университета. 2010. 1 (1): 59-63.

Поступила 01.08.2014

(Контактная информация: **Сидорова Оксана Игоревна** – аспирант Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460052, г. Оренбург, пр. Победы 178/1, кв. 242; 8(922) 807-90-84;

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

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)