

ФОРМИРОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ ОБЛИГАТНО-АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Рассмотрение инфекции как формы симбиотических отношений микроорганизмов и человека позволило обосновать представление об инфекции как модельной системе ассоциативного симбиоза. Микросимбиоз является одним из векторов ассоциативного симбиоза, где происходит формирование ассоциаций микроорганизмов с различными типами связей. Значительный вклад в понимание инфекционной симбиологии внесли новые методические подходы с использованием персистентного потенциала микробов в оценке микросимбиоза. Изучение механизмов межмикробных взаимодействий показало, что в основе формирования микросимбиоза лежат связи, обуславливающие характер взаимоотношений – синергидные и антагонистические.

Поскольку результаты экспериментов *in vitro* выявили, что под действием супернатантов происходит в разной степени как увеличение, так и снижение биологических свойств, а также наблюдается отсутствие изменения исследуемых показателей (индифферентный эффект), для установления синергидных и антагонистических связей полученный фактический материал был обработан с помощью дискриминантного анализа, который интегрировал исследуемые свойства: ростовые свойства, биопленкообразование, антилизоцимную активность. Это позволило выделить ассоциации с «синергидным» типом связи: *B. bifidum/B. longum*; *B. longum/E. limosum*; *E. limosum/B. fragillis*; *C. perfringens/B. fragilis* и «антагонистическим» - *E. limosum/C. perfringens*.

В естественных условиях подавляющее большинство микроорганизмов существует в виде ассоциаций, формирование которых дает определенное преимущество членам микробного сообщества при выживании в различных биотопах организма человека. Проведенные исследования позволили установить, что помимо ростовых свойств, в ассоциациях облигатно-анаэробных бактерий, происходит изменение биологических свойств (биопленкообразование, антилизоцимная активность), составляющих системообразующий фактор микросимбиоза, что вносит вклад в понимание механизмов формирования ассоциативного симбиоза человека и может иметь значение при создании микробных композиций новых синбиотиков.

Ключевые слова: облигатно-анаэробные бактерии, межмикробные взаимодействия, антилизоцимная активность, биопленкообразование, ростовые свойства, ассоциативный симбиоз.

Рассмотрение инфекции как формы симбиотических отношений микроорганизмов и человека позволило обосновать представление об инфекции как модельной системе ассоциативного симбиоза. Микросимбиоз является одним из векторов ассоциативного симбиоза, где происходит формирование ассоциаций микроорганизмов с различными типами связей [1]. Значительный вклад в понимание инфекционной симбиологии внесли новые методические подходы с использованием персистентного потенциала микробов в оценке микросимбиоза. Изучение механизмов межмикробных взаимодействий показало, что в основе формирования микросимбиоза лежат связи, обуславливающие характер взаимоотношений – синергидные и антагонистические [2].

Ранее проведенные исследования взаимоотношений ассоциаций микроорганизмов кишечника проводились на моделях факультативно-анаэробных бактерий. Было установлено изменение персистентных свойств в зависимо-

сти от микрoэкологического состояния кишечника человека [3]–[5].

Вместе с тем, отсутствуют работы по изменению биологических свойств облигатно-анаэробных бактерий в ассоциациях при участии их метаболитов, что и определило цель нашей работы.

Цель: определить характер взаимодействий микросимбиотиков при формировании ассоциаций облигатно-анаэробных бактерий толстого кишечника человека под контролем ростовых свойств, биопленкообразования и антилизоцимной активности.

Материалы и методы

В работе по исследованию изменений биологических свойств в ассоциациях облигатно-анаэробных микроорганизмов были изучены по 6 штаммов каждого вида бактерий: *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *Eubacterium limosum*, *E. contortum*, *Bacteroides fragillis*, *B. ovatus*, *Propionibacterium acnes*, *P. granulosum*, *Clostridium ram-*

nosum, *S. perfringens* (коллекция лаборатории биологического мониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), ранее изолированные из микросимбиоза кишечника пациентов при обследовании на дисбиоз и верифицированные с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT с программным обеспечением Maldi BioTyper 3,0 (Bruker Daltonics, Германия).

Для изучения изменения биологических свойств в ассоциациях облигатно-анаэробных бактерий использовали супернатанты (экзо-метаболиты) микроорганизмов. Для этого воздействующие культуры облигатно-анаэробных бактерий выращивали в питательном бульоне Schaedler (BBL, США) в анаэробном термостате (Binder, Германия) при 37°C в течение 48 часов. Конечная оптическая плотность бульонных культур облигатно-анаэробных микроорганизмов в среднем составляла $0,17 \pm 0,01 OD_{450}$. Далее, полученные культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут и стерилизовали фильтрованием, пропуская через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, Франция). Полученные супернатанты облигатно-анаэробных бактерий в количестве 0,1 мл соинкубировали с чистой культурой исследуемых анаэробов, инокулированных в 2,9 мл питательного бульона. В качестве контроля использовали бульонные культуры, выращенные без добавления метаболитов облигатно-анаэробных бактерий.

На заключительном этапе определяли показатели биологических свойств: ростовые свойства (РС) по оптической плотности бульонной культуры на фотометре iEMS-MF (Labsystem, Финляндия), антилизоцимную активность (АЛА) – фотометрическим методом по О.В. Бухарину с соавт. (1999), образование биоплёнок (БПО) на поверхности 96-луночной полистироловой стерильного планшета по O'Toole G. (1999).

Статистическую обработку материалов и графическое изображение результатов проводили с использованием программ: Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998, Microsoft Office Excel 2003. Определяли

M – среднее арифметическое, m – среднюю ошибку среднего арифметического, при этом данные представлялись по форме $M \pm m$. Для выявления типов связей («синергидный» тип – «антагонистический» тип) между облигатно-анаэробными бактериями был применен «Дискриминантный анализ».

Результаты и обсуждения

Полученные экспериментальные данные по изменению биологических свойств микросимбионтов показали, что в ассоциациях облигатно-анаэробных бактерий происходит изменение ростовых свойств, биопленкообразования и антилизоцимной активности исследуемых микроорганизмов. Поскольку результаты проведенных экспериментов *in vitro* выявили, что под действием супернатантов происходит в разной степени как увеличение, так и снижение биологических свойств, а также наблюдается отсутствие изменения исследуемых показателей (индифферентный эффект), для установления синергидных и антагонистических связей нами была предпринята попытка систематизировать полученный фактический материал с помощью дискриминантного анализа. Для этого полученные экспериментальные данные были объединены в интегральный показатель по все трем биологическим свойствам и представлены в виде адекватного математического выражения:

$$D = x_1 a_1 + x_2 a_2 + x_3 a_3 + C,$$

где D – дискриминантная функция, характеризующая искомый вариант взаимодействий между облигатно-анаэробными микроорганизмами; x_1 – различие между значением ростовых свойств в опыте (под действием супернатантов облигатных бактерий) и контроле (без влияния супернатантов исследуемых анаэробов) в %; x_2 – различие между значением биопленкообразования в опыте (под действием супернатантов облигатных бактерий) и контроле (без влияния супернатантов исследуемых анаэробов) в %; x_3 – различие между значением антилизоцимной активности в опыте (под действием супернатантов облигатных бактерий) и контроле (без влияния супернатантов исследуемых анаэробов) в %; a – коэффициент показателя; C – поправочная константа.

В таблице 1 представлены коэффициенты (a) для каждого показателя и поправочные константы.

Для установления принадлежности исследуемых штаммов по направленности действия к «синергидным» или «антагонистическим» связям, находили разницу полученных у исследуемых штаммов облигатных бактерий количественных значений по показателям в опыте (различие между значением свойства в опыте (под действием супернатантов облигатных бактерий) и контроле (без влияния супернатантов исследуемых анаэробов), переводя их в проценты и используя для расчета дискриминантной функции по приведенной формуле [7]. Расчет проводили по всем строкам соответствующей таблицы.

Наибольшая величина дискриминантной функции из всех полученных будет в 82,4% случаев соответствовать обозначенному на данной строке результату (типу) направленности взаимодействий.

К примеру, исследуемый штамм *B. longum* характеризовался следующими признаками: РС – 0,74 OD₄₅₀, БПО – 0,35 ед., АЛА – 0,8 мкг/мл*ОД, после воздействия экзометаболитов *B. bifidum*, исследуемые свойства *B. longum* изменились: РС – 0,9 OD₄₅₀, БПО – 0,48 ед., АЛА – 1,0 мкг/мл*ОД. Разница между опытным и контрольными значениями в процентах составила: РС – (+21%), БПО – (+37%), АЛА – (+20%). Расчет по формуле с использованием представленных в таблице коэффициентов показал, что:

$$D_c = 6,62144 \cdot 21 + 6,36149 \cdot 37 + 1,35796 \cdot 20 + (-5,58339) = 395,96$$

$$D_a = 5,76822 \cdot 21 + 3,29663 \cdot 37 + 0,56319 \cdot 20 + (-3,39738) = 250,9$$

В результате проведенного расчета максимальная величина дискриминантной функции установлена на первой строке (D_c), что

позволило выявить «синергидный» тип связи между исследуемыми культурами *B. bifidum* и *B. longum*.

Другой штамм *C. perfringens* характеризовался следующими признаками: РС – 0,8 OD₄₅₀, БПО – 0,38 ед., АЛА – 0,59 мкг/мл*ОД, после воздействия экзометаболитов *B. bifidum*, исследуемые свойства *C. perfringens* изменились: РС – 0,2 OD₄₅₀, БПО – 0,1 ед., АЛА – 0,35 мкг/мл*ОД. Разница между опытным и контрольными значениями в процентах составила: РС – (-75%), БПО – (-74%), АЛА – (-41%). Расчет по формуле с использованием представленных в таблице коэффициентов показал, что:

$$D_c = 6,62144 \cdot (-75) + 6,36149 \cdot (-74) + 1,35796 \cdot (-41) + (-5,58339) = -1028,48$$

$$D_a = 5,76822 \cdot (-63) + 3,29663 \cdot (-52) + 0,56319 \cdot (-51) + (-3,39738) = -703,08$$

В результате проведенного расчета максимальная величина дискриминантной функции установлена на второй строке (D_a), что позволило выявить «антагонистический» тип связи между исследуемыми культурами *B. bifidum* и *C. perfringens*. Помимо распространенности типов взаимодействий, мы находили медианы и квартили значений каждой отдельной группы ассоциаций облигатно-анаэробных бактерий.

При анализе распространенности типов взаимодействий между исследуемыми штаммами облигатно-анаэробных бактерий все исследуемые группы микроорганизмов были представлены в виде графиков (рис. 1).

Как видно из рисунка, при влиянии супернатантов бифидобактерий на культуры *B. bifidum* в большинстве случаев (72±0,69%) наблюдался «синергидный» тип взаимодействий (630 [441; 720]). Такой же тип взаимодействий был характерен при действии супернатантов *B. longum* (в 94±0,33% случаев, 663 [542; 765]), *B. adolescentis* (в 82±1,02% случаев, 495 [344; 863]) и *B. catenulatum* (в 97±0,1% случаев, 721 [692; 750]). Реже

Таблица 1 – Коэффициенты показателей и поправочные константы для дифференциации «синергидных» и «антагонистических» связей облигатно-анаэробных бактерий

Связи	Ростовые свойства	БПО	АЛА	С
«синергидные» связи (D_c)	6,62144	6,36149	1,35796	-5,58339
«антагонистические» связи (D_a)	5,76822	3,29663	0,56319	-3,39738

встречался «антагонистический» тип взаимодействий, который был выявлен не более чем в 27% случаев для штаммов *B. bifidum*.

Аналогичная картина наблюдалась при действии исследуемых супернатантов облигатно-анаэробных бактерий на культуры *B. longum*. «Синергидный» тип взаимодействий был характерен для 63±0,88% случаев (828 [625; 991]) при влиянии супернатантов *B. bifidum* на *B. longum*. Такой же тип взаимодействий наблюдался при действии супернатантов *B. longum* (в 91±0,41% случаев, 824 [552; 940]), *B. adolescentis* (в 72±0,69% случаев, 725 [568; 780]) и *B. catenulatum* (в 63±0,88% случаев, 739 [496; 750]). Напротив, «антагонистический» тип взаимодействий встречался реже и был выявлен в 37% случаев у штаммов *B. longum*.

При влиянии исследуемых супернатантов на культуры *P. acnes* был характерен «антагонистический» тип взаимодействий: в 76±1,22% случаев при влиянии экзометаболитов *B. bifidum* (-252 [-382; 154]), в 62±0,98% - при влиянии *B. longum* (-305 [-538; 269]) и в 67±1,92% – при действии супернатантов *B. adolescentis* (-315 [422; -151]). «Синергидный» тип наблюдался при взаимодействии супернатантов *B. catenulatum* и культур пропионибактерий в 97±0,1% случаев (519 [432; 606]).

При действии экзометаболитов *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* и *B. catenulatum* на культуры *E. limosum* «синергидный» тип взаимодействий наблюдался не более чем в 67% случаев. При влиянии супернатантов бифидо-

бактерий на культуры эубактерий в большинстве случаев (60±0,69%) наблюдался «синергидный» тип взаимодействий (630 [441; 720]). Такой же тип взаимодействий был характерен при действии супернатантов *B. longum* (в 67±0,33% случаев, 663 [542; 765]), *B. adolescentis* (в 60±1,02% случаев, 495 [344; 863]) и *B. catenulatum* (в 60±0,1% случаев, 721 [692; 750]). Реже встречался «антагонистический» тип взаимодействий, который был выявлен не более чем у 40% штаммов эубактерий.

Напротив, для культур *B. fragillis* и *C. perfringens* чаще были характерны «антагонистические» взаимодействия с исследуемыми культурами бифидобактерий. При действии метаболитов *B. catenulatum* на бактериоидов (-105 [238; 29] и клостридий (-112 [242; 19]) в 97±0,1% случаев наблюдался «антагонистический» тип. Напротив, «синергидный» тип взаимодействий был выявлен не более чем у 46±2,0% бактериоидов и 47±1,67 клостридий % в зависимости от вида бифидобактерий.

При влиянии супернатантов клостридий на культуры *B. bifidum* в 73±1,57% (670 [468; 882]) и *B. longum* в 97±0,1 % (236 [174; 421]) наблюдался «синергидный» тип взаимодействий (рис. 2). Такой же тип был характерен при влиянии исследуемого экзометаболита на бактериоидов (в 82±0,9 % случаев, 834 [618; 1016]) и клостридий (в 87±0,93 % случаев, 877 [720; 1018]).

«Синергидный» тип взаимодействий наблюдался при действии супернатантов бактериоидов на *B. bifidum* (в 97±0,1% случаев, 385

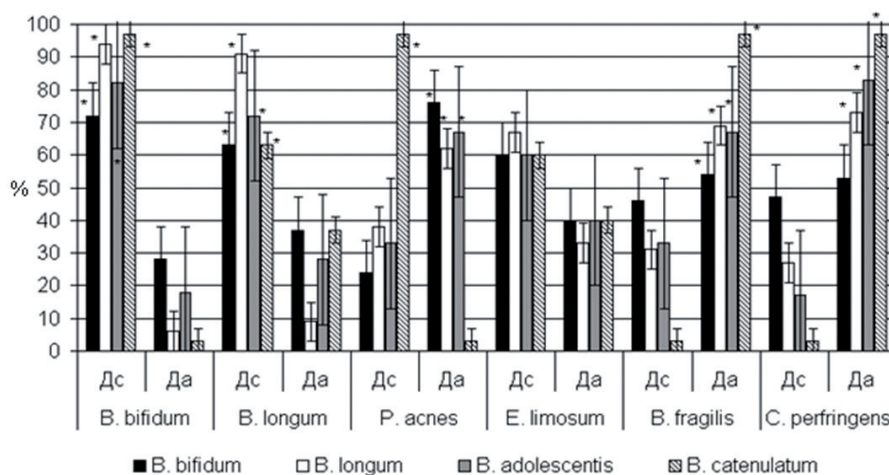


Рисунок 1 – Распространенность типов взаимодействий между облигатно-анаэробными микроорганизмами под влиянием супернатантов *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* и *B. catenulatum*

[384; 406]), *B. longum* (в $97 \pm 0,1\%$ случаев, 596 [588; 603]), *E. limosum* (в $80 \pm 1,4\%$ случаев, 612 [599; 671]), *B. fragillis* (в $80 \pm 2,0\%$ случаев, 516 [493; 534]) и *C. perfringens* (в $60 \pm 2,83\%$ случаев, 503 [471; 599]). «Антагонистический» тип был характерен для культур пропионибактерий в $97 \pm 0,1\%$ случаев (-429 [-451; -333]).

Аналогичная картина наблюдалась при действии исследуемых супернатантов *E. limosum* на культуры *B. bifidum* в $60 \pm 2,83\%$ случаев (600 [578; 741]), *B. longum* в $67 \pm 3,32\%$ случаев (635 [611; 660]), *P. acnes* в $97 \pm 0,1\%$ случаев (746 [718; 769]), *E. limosum* в $97 \pm 0,1\%$ случаев (391 [338; 473]) и *B. fragillis* в $60 \pm 2,83\%$ случаев (873 [633; 977]). «Антагонистический» тип взаимодействий был характерен для $67 \pm 3,32\%$ случаев (-415 [-436; -395]) при влиянии супернатантов зубактерий на *C. perfringens*.

Заключение

В естественных условиях подавляющее большинство микроорганизмов существуют в виде ассоциаций, формирование которых дает определенное преимущество членам микробного сообщества при выживании в различных биотопах организма человека. Не стихающий интерес к изучению механизмов формирования микробных сообществ, особенно облигатно-анаэробных бактерий, также обусловлен их прикладным значением, поскольку данные микроорганизмы часто являются объектом биотехнологических производств и широко используются в составе пробиотических препаратов.

Ранее в работах по исследованию механизмов межмикробных взаимоотношений между различными видами облигатно-анаэробных бактерий было показано изменение ростовых характеристик бактерий. Так, Bartosch S. с соавторами [9] и Rey F.E. с соавторами [10] установили, что сокультивирование штаммов бифидобактерий (*B. bifidum* и *B. lactis*) приводило к увеличению их роста. В нашей работе, при исследовании ростовых свойств, вкупе с показателями адаптации бактерий (антилизозимная активность и биопленкообразование), также были показаны синергидные взаимодействия между различными видами бифидобактерий (*B. bifidum/B. longum*). В другой работе *Bacteroides thetaiotaomicron* стимулировал рост *Bacteroides hydrogenotrophica*. Кроме того, в ассоциации облигатно-анаэробных бактерий происходит обмен генетическим материалом как это было показано на примере *Bacteroides spp.* и *Clostridium spp.* [8]. Формирование синергидных связей при совместной утилизации питательных субстратов было исследовано на моделях *B. longum/B. thetaiotaomicron*; *Bacteroides spp./Clostridium spp.*; *B. adolescentis/Roseburia spp.* и *B. adolescentis/E. rectale* [11], [12], [13], что также подтверждает полученные нами результаты взаимодействия при влиянии метаболитов облигатно-анаэробных бактерий на их биологические свойства (*C. perfringens/B. fragillis*; *B. longum/E. limosum*; *E. limosum/B. fragillis*).

Проведенные исследования позволили установить, что помимо ростовых свойств, в

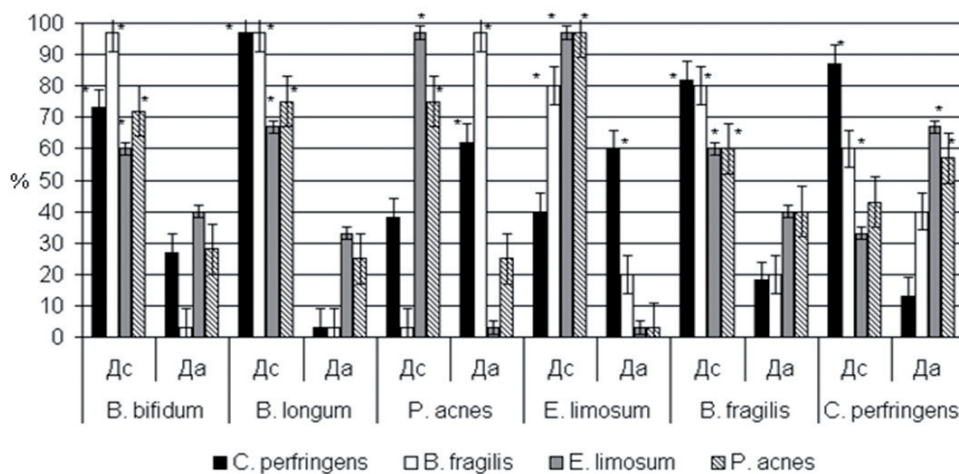


Рисунок 2 – Распространенность типов взаимодействий между облигатно-анаэробными микроорганизмами под действием супернатантов *C. perfringens*, *B. fragillis*, *E. limosum* и *P. acnes*

ассоциациях облигатно-анаэробных бактерий, происходит изменение биологических свойств (биопленкообразование, антилизоцимная активность), составляющих системообразующий фактор микросимбиоза, что вносит вклад

в понимание механизмов формирования ассоциативного симбиоза человека и может иметь значение при создании микробных композиций новых синбиотиков.

02.10.2017

**Исследование выполнено при финансовой поддержке
Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере
(проект конкурса «УМНИК») и инновационных научно-исследовательских
и опытно-конструкторских работ аспирантов (соглашение № 24)**

Список литературы:

1. Симбиоз и его роль в инфекции / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.Б. Перунова [и др.]. - Уральский центр академического обслуживания Екатеринбург, 2011. - 300 с.
2. Бухарин, О.В. Микросимбиоз / О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова. - Екатеринбург, 2014. - 257 с.
3. Перунова, Н.Б. Характеристика биологических свойств микроорганизмов в бактериально-грибковых ассоциациях кишечника человека / Н.Б. Перунова. - Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Оренбург, 2003. - 25 с.
4. Елагина Н.Н. Факторы персистенции неспорообразующей анаэробной микрофлоры кишечника человека. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2000. - 24 с.
5. Иванова, Е.В. Биологические свойства бифидобактерий и их взаимодействие с микросимбионтами кишечной микрофлоры человека / Е.В. Иванова. - Дис. ... канд. мед. наук. - Оренбург, 2010. - 128 с.
6. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // Ann Rev Microbiol. - 1999. - No. 54. - P. 49-79.
7. Алгоритмы: построение и анализ. Introduction to Algorithms / Т. Кормен, Ч. Лейзерсон, Р. Ривест [и др.]. - М.: Вильямс, 2005. - 1296 с.
8. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon / N.B. Shoemaker, H. Vlamakis, K. Hayes [et al] // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - No. 67. - P. 561-568.
9. 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 / S. Bartosch, E.J. Woodmansey, Paterson [et al] // Clin Infect Dis. - 2005. - No 70 (6). - P. 28-37.
10. Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens / F.E. Rey, J.J. Faith, J. Bain [et al] // The Journal of biological chemistry. 2010. - No 285 (29) - P. 22082-22090.
11. Амерханова, А.М. Научно-производственная разработка новых препаратов-синбиотиков и клинико-лабораторная оценка их эффективности / А.М. Амерханова. - Дис. ... д-ра биол. наук. - М., 2009. - 260 с.
12. Шестаков, С.В. Метагеномика микробиома человека / С.В. Шестаков // Успехи современной биологии. - 2010. - Т. 30. - № 6. - С. 531-543.
13. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome / J.G. Banwell, L.A. Kistler, R.A. Giannella [et al] // Gastroenterology. - 1981. - No. 80. - P. 834-845.

Сведения об авторах:

Бекпергенова Анастасия Владимировна, научный сотрудник, аспирант Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел.: 775417; e-mail: nsavasteeva@gmail.com

Хлопко Юрий Александрович, ведущий научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; д.т.н.,

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел.: 775417; e-mail: otbiosistem@mail.ru

Иванова Елена Валерьевна, доцент, ведущий научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; к.м.н.

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел.: 775417; e-mail: walerewna13@gmail.com

Перунова Наталья Борисовна, заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; д.м.н.

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел.: 775417; e-mail: perunovanb@gmail.com