

МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БИФИДОБАКТЕРИЙ К ЛИПОЛИТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТАМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ЗАХАРОВА Ю.В.¹, ОТДУШКИНА Л.Ю.¹, ЛЕВАНОВА Л.А.¹, СУХИХ А.С.²

¹Кафедра микробиологии, иммунологии и вирусологии,

²Центральная научно-исследовательская лаборатория

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Кемерово, Россия

ORIGINAL ARTICLE

MECHANISMS OF BIFIDOBACTERIA RESISTANCE TO LIPOLYTIC ENZYMES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

YULIYA V. ZAKHAROVA, LYUDMILA Y. OTDUSHKINA, LYUDMILA A. LEVANOVA, ANDREY S. SUKHIKH

*Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056),
Russian Federation*

Резюме

Цель. Изучение механизмов устойчивости мембраны бифидобактерий разных видов к действию липаз *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы. Исследовали количественный и качественный состав жирных кислот мембран бифидобактерий до и после воздействия на них липолитических ферментов *S.aureus* с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС).

Результаты. У *Bifidobacterium breve* основную массу мембранных жирных кислот составляли олеиновая (С 18:1; 80,3 мкг), пальмитиновая (С 16:0; 53,9 мкг), линолевая (С 18:2; 29,4 мкг) кислоты. У *B.bifidum* и *B.longum* доминировали насыщенные пальмитиновая (С 16:0; 21,2 мкг и 21,8 мкг соответственно) и стеариновая (С 18:0; 18,8 мкг и 11,9 мкг соответственно) кислоты. После воздействия липаз *S.aureus* у *B.breve* увеличивалось в 2 раза содержание насыщенных жирных

кислот, снижалась в 7 раз масса ненасыщенных кислот и изменялось разнообразие жирнокислотного состава. У *B.bifidum* и *B.longum* под влиянием липолитических ферментов золотистого стафилококка происходило снижение массы насыщенных жирных кислот.

Заключение. Механизмы резистентности мембраны бифидобактерий к воздействию липолитических ферментов *S.aureus* являются видоспецифичными. У *B. breve* происходит изменение жидко-кристаллического состояния мембраны, которое осуществляется за счет уменьшения разнообразия и изменения соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Клеточные мембраны *B.longum* и *B. bifidum* характеризуются устойчивостью к действию липаз стафилококков, что обусловлено высоким содержанием насыщенных жирных кислот.

Ключевые слова: бифидобактерии, стафилококки, ГХ-МС, жирные кислоты, устойчивость.

English ►

Abstract

Aim. To study the mechanisms of Bifidobacteria membrane resistance to the lipases of *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods. Quantitative and

qualitative composition of fatty acids in membranes of Bifidobacteria was evaluated before and after exposure to the lipolytic enzymes of *S. aureus* using gas chromatography-mass spectrometry.

Results. Membrane of *Bifidobacterium breve* consisted of oleic (C 18:1; 80,3 µg), palmitic (C 16:0; 53,9 µg), and linoleic (C 18:2; 29,4 µg) acid, while membranes of *B. bifidum* and *B. longum* were composed mainly of palmitic (C 16:0; 21,2 µg and 21,8 µg, respectively) and stearic (C 18:0; 18,8 µg and 11,9 µg, respectively) acid. Upon exposure to the *S. aureus* lipase, the proportion of saturated fatty acids in the membrane of *B. breve* increased twofold, with the corresponding sevenfold decrease in unsaturated fatty acids and altered diversity of fatty acid composition. However, this

was not the case for the membranes of *B. bifidum* and *B. longum*.

Conclusions. Mechanisms of Bifidobacteria resistance to the lipolytic enzymes of *S. aureus* are species-specific. In *B. breve*, a change in the liquid-crystalline state of the membrane occurs; however, the membranes of *B. longum* and *B. bifidum* are resistant to the action of *S. aureus* lipases due to the high content of saturated fatty acids.

Keywords: bifidobacterium, staphylococcus, gas chromatography-mass spectrometry, fatty acids, resistance.

Введение

Большое разнообразие и в то же время специфичность мембранных жирных кислот микроорганизмов обеспечивает возможность проведения родовой и даже видовой идентификации бактерий [1, 2]. Однако, являясь основным компонентом фосфолипидов, жирные кислоты определяют также физико-химическое состояние мембраны – ее текучесть и вязкость [2, 3]. Только при определенных параметрах текучести и вязкости данной оболочки у бактерий осуществляется рост и размножение, транспорт веществ, функционирование мембранных ферментов [3, 4]. Состав фосфолипидов определяет также гидрофобность клеток, адгезивные свойства, чувствительность к антибактериальным препаратам, устойчивость к перекисному окислению [5, 6, 7]. Бактериальная цитоплазматическая мембрана является ключевой мишенью для стрессовых факторов микросреды биотопа. На физические и химические воздействия микроорганизмы реагируют определенными метаболическими реакциями и изменением состава мембранных фосфолипидов [8, 9]. Регулирование бактериями параметров текучести мембраны для поддержания собственного гомеостаза при воздействии внешних факторов среды получило название гомеофазовой адаптации [10]. Стратегия модуляции жирнокислотного состава мембраны лежит в основе выживания штаммов во внешней среде при воздействии дезинфицирующих и антисептических средств, мембранных токсинов, резких перепадов температуры и давления. В связи с этим различные механизмы гомеофазовой адаптации активно изучаются для разработки превентивных мер по формированию госпитальных штаммов в экологической системе стационаров [10, 11]. Су-

щественный интерес представляют собой исследования модификации липидного состава цитоплазматической мембраны у бактерий, входящих в состав кишечного микросимбиоза, так как разнообразие входящих в него микросимбионтов и их метаболитов формирует особые экологические факторы и условия. Остается открытым вопрос о регулировании текучести мембраны у бифидобактерий при взаимодействии их с условно-патогенными и патогенными бактериями, выделяющими липолитические ферменты, что необходимо для уточнения механизмов доминирования бифидобактерий в кишечном микросимбиозе и в поддержании нормобиоценоза.

Цель исследования

Изучение механизмов устойчивости мембраны бифидобактерий разных видов к действию липаз *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы

Объектом исследования были фекальные изоляты *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum*, *B. longum*. Выделение бифидобактерий осуществляли на Бифидум-среде (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для создания анаэробных условий применяли анаэроостаты (BBL, США) и газогенерирующие пакеты (НПО «Новое дело», Санкт-Петербург). Идентификацию бифидобактерий осуществляли с помощью коммерческих тест-систем ANAERO-TEST 23 (Lachema, Чехия).

Продуцент липаз *S. aureus* также был изолирован из кишечника. Идентифицирован с помощью тест-системы «Пластины биохимические для дифференциации стафилококков» (г. Нижний Новгород). Штамм характеризовался продукцией лецитиназы и липазы, активность

которых количественно исследовали спектрофотометрическим методом с использованием набора «LIPASA liquicolor» (HUMAN, Германия) на приборе СФ-2000.

Для получения экзометаболитов стафилококка проводили культивирование штамма в МПБ (г. Нижний Новгород) при 37°C в течение 24 часов. Суточную бульонную культуру центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут, отбирали супернатанты, обрабатывали их хлороформом 20 минут, центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут и снова отбирали супернатанты. Стерильность экзометаболитов определяли путем посева супернатанта на среду Мюллера-Хинтона (НИЦФ, Санкт-Петербург) и последующим инкубированием при 37° С в течение 24 часов.

Полученные экзометаболиты добавляли в объеме 0,3 мл в 2,7 мл жидкой Бифидум-среды (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск), куда помещали по 1 колонии бифидобактерий, выращенных на плотной Бифидум-среде (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) в анаэробных условиях.

До и после обработки бифидобактерий экзометаболитами стафилококка изучали их биологические свойства, на которые влияет жирнокислотный состав мембраны: гидрофобность, способность к адгезии и к аутоагглютинации [3, 6, 12]. Гидрофобность рассчитывали в % согласно [6]. Штаммы считали высокогидрофобными при $H = 60\%$ и $>$, среднегидрофобными при $H = 40-59\%$, низкогидрофобными при $H \leq 39\%$. Способность специфически адгезироваться к гликопротеиновым рецепторам кишечника оценивали по индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ) [13]. Бактерии считали неадгезивными при индексе адгезии микроорганизмов $\leq 1,75$; низкоадгезивными – при ИАМ от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – при ИАМ от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивными при ИАМ $\geq 4,0$.

Жирнокислотный состав бактериальных фосфолипидов определяли с помощью газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Липидная фракция выделена из отмытой изотоническим раствором NaCl бульонной культуры бифидобактерий экстракцией смесью хлороформ : n-гексан (1:1). Полученный экстракт подвергали метилированию. Образец объемом 1 мл помещали в вialу объемом 1,5 мл, растворитель отдували азотом досуха. К сухому остатку добавляли 500 мкл 3% раство-

ра H_2SO_4 в MeOH. К полученному раствору добавляли внутренний стандарт (10 мкг ундеценовой кислоты). Затем образец нагревали при 90°C в течение часа. Далее проводили экстракцию 700 мкл гексана. Объем отобранной гексановой фракции концентрировали отдувкой растворителя до объема 200 мкл. Полученные пробы, содержащие жирные кислоты в виде метиловых эфиров, использовали для анализа. Метилированные пробы анализировали на хроматомасс-спектрометре Agilent 7000B. Объем пробы 2 мкл, ввод без деления потока. Колонка: ZB-WAX, 30м*0.25мм*0.25мкм, Условия хроматографирования: Oven Program 50 °C for 0 min then 8 °C/мин to 260 °C-5мин, Flow-1мл/мин.

Данные представлены в виде абсолютных и относительных величин. Характер распределения переменных величин в рассматриваемой совокупности определяли с помощью построения гистограмм. В связи с тем, что характер распределения данных не соответствовал нормальному, для статистической обработки применяли непараметрические критерии оценки статистической значимости. Сравнение структуры жирных кислот у бифидобактерий разных видов проводили с помощью критерия χ^2 . Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты исследования

Среди жирных кислот у *Bifidobacterium breve* преобладали ненасыщенные, масса которых достигала 119,3 мкг, при этом соотношение масс ненасыщенных жирных кислот к насыщенным составило 2:1. У *B.bifidum* и *B.longum* в составе фосфолипидов преобладали насыщенные жирные кислоты (46,6 мкг и 39,5 мкг), а соотношение масс ненасыщенных к насыщенным кислотам составило 1:5 и 1:4 соответственно. Независимо от вида бифидобактерий среди ненасыщенных кислот большая доля приходилась на изоформы: у *B.breve* - 73,2%, *B.longum* – 71,6%, у *B.bifidum* - 70,1%. Как и у большинства микроорганизмов, жирные кислоты бифидобактерий были представлены длинноцепочечными (C16 – C22), содержание которых у *B. breve* достигало 189,4 мкг, у *B.longum* составило 44,2 мкг, у *B.bifidum* только 28,4 мкг. Масса среднецепочечных жирных кислот (C13 – C14) составила 12,3 мкг, 6,3 мкг и 2,5 мкг соответственно. В

составе мембранных липидов регистрировали также очень длинные жирные кислоты (C24), однако их содержание было низким и не превышало 0,88 мкг у *B.breve*, 0,4 мкг у *B.longum* и 0,33 мкг у *B.bifidum*. Разница в содержании жирных кислот с разными типами ацильных цепей у исследуемых видов бифидобактерий была статистически значима ($\chi^2=10,2$, $df=4$, $p=0,05$).

У *B.breve* в составе фосфолипидов регистрировали высокое содержание олеиновой (C 18:1; 80,3 мкг), пальмитиновой (C 16:0; 53,9 мкг) и полиненасыщенной линолевой кислоты (C 18:2; 29,2 мкг). У *B. bifidum* и *B.longum* среди жирных кислот преобладали насыщенные пальмитиновая (C 16:0) и стеариновая кислоты (C 18:0), масса которых составила 21,2 и 21,8 мкг, а также 18,8 и 11,9 мкг соответственно. Содержание ненасыщенной олеиновой кислоты (C 18:1) у *B.bifidum* не превышало 5,3 мкг, а линолевой кислоты (C 18:2) – 3,1 мкг. У *B.longum* содержание олеиновой (C 18:1) и линолевой (C 18:2) кислот было схожим и составило по 3,1 мкг. Установлено, что в составе липидов всех видов бифидобактерий присутствовали метилированные жирные кислоты, которые увеличивают текучесть мембраны. Однако содержание разветвленных жирных кислот у *B.breve* было в 4,1 раза выше, чем у *B.bifidum* и в 3 раза выше, чем у *B.longum*. При этом масса метилированных форм жирных кислот у *B.bifidum* и *B.longum* составила только 0,7 и 0,8 мкг соответственно. Различия в количественном содержании жирных кислот у бифидобактерий разных видов были статистически значимы ($\chi^2=115,6$, $df=18$, $p=0,0003$).

После обработки бифидобактерий экзо-метаболическими *Staphylococcus aureus* структура жирных кислот статистически значимо изменялась у *B.breve*, что свидетельствует о способности данного вида к гомеофазовой адаптации при неблагоприятных условиях ($\chi^2=121,3$, $df=19$, $p=0,0004$). Прежде всего, у *B.breve* увеличилось количество насыщенных жирных кислот, за счет чего менялось соотношение масс ненасыщенных и насыщенных жирных кислот, которое составило 1:9. Содержание стеариновой (C 18:0) и пальмитиновой (C 16:0) кислот составило 71,3 мкг и 78,5 мкг соответственно, что в 4,6 и 1,5 раза выше, чем до воздействия липаз стафилококка. Масса олеиновой кислоты (C 18:1) снизилась

в 10 раз - до 7,7 мкг. Также у *B.breve* снижалось разнообразие жирных кислот. В составе мембранных липидов уже отсутствовали такие насыщенные жирные кислоты с длинными цепями, как эйкозановая (C 20:0), докозановая (C 22:0), тетракозановая кислоты (C 24:0) и ненасыщенная докозеновая кислота (C 22:1). Уменьшалась в 1,5 раза масса среднецепочечных жирных кислот – тридекановой (C 13:0), миристиновой (C 14:0), тетрадеценовой (C 14:1) – с 6,7 мкг до обработки липазы стафилококка до 4,3 мкг после обработки.

После взаимодействия с метаболитами стафилококка у *B.bifidum* количественное содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот практически не изменялось ($\chi^2=27,2$, $df=20$, $p=0,6$). По-прежнему в мембранных липидах преобладали кислоты с высокой степенью насыщения (76%), соотношение содержания ненасыщенных жирных кислот к массе насыщенных составило 1:3. Содержание пальмитиновой (C 16:0) и стеариновой кислот (C18:0) снизилось незначительно до 19,8 мкг и 14,6 мкг соответственно. Не изменилась масса линолевой (C 18:2; 3,01 мкг) и олеиновой (C 18:1; 5,2 мкг) кислот. Однако, у *B.bifidum* под влиянием липаз золотистого стафилококка увеличивалось разнообразие жирных кислот за счет появления эйкозановой (C 20:0), докозановой (C 22:0) и тетракозановой (C 24:0) кислот, но их содержание не превышало 1,1 мкг. При этом установлено, что у *B.bifidum* после воздействия липаз стафилококка увеличилась масса метилированных жирных кислот, так как их содержание возросло в 2 раза.

У *B.longum*, так же, как и у *B.bifidum* регистрировали относительную устойчивость мембраны к действию липаз *S.aureus*, так как статистически значимые изменения в жирнокислотном составе мембраны отсутствовали ($\chi^2=30,5$, $df=21$, $p=0,6$). В составе липидов *B.longum* после воздействия липолитических ферментов доминирующее место в структуре также занимали насыщенные жирные кислоты (81,3%), масса которых составила 32,5 мкг. При этом сохранилось такое же, как и до воздействия экзометаболических стафилококков соотношение масс ненасыщенных и насыщенных жирных кислот (1 : 3). Содержание пальмитиновой (C 16:0) и стеариновой кислот (C 18:0) незначительно снизилось до 17,7 мкг

Таблица 1. Биологические свойства бифидобактерий

Наименование признака, ед.измерения	B.breve*		B.bifidum		B.longum	
	До обработки липазами	После обработки липазами	До обработки липазами	После обработки липазами	До обработки липазами	После обработки липазами
Аутоагглютинация, %	41,1	20,6	17,7	13,8	11,2	12,8
Гидрофобность, %	86,7	56,2	47,2	45,4	40,5	41,1
Индекс адгезии микроорганизмов	4,2	3,9	1,1	1,2	2,2	1,8

Примечание: * - статистически значимая разница биологических свойств до и после действия липаз *S.aureus* ($p=0,023$)

Table 1. Biological properties of bifidobacteria

Feature	B.breve*		B.bifidum		B.longum	
	Before exposure to lipases	After exposure to lipases	Before exposure to lipases	After exposure to lipases	Before exposure to lipases	After exposure to lipases
Autoagglutination, %	41.1	20.6	17.7	13.8	11.2	12.8
Hydrophobicity, %	86.7	56.2	47.2	45.4	40.5	41.1
Adhesion index	4.2	3.9	1.1	1.2	2.2	1.8

* $p=0.023$

и 9,9 мкг соответственно. Уменьшилось и количество олеиновой (С 18:1) и линолевой (С 18:2) кислот до 2,9 и 2,2 мкг. При этом возросла в 1,5 раза масса метилированных форм насыщенных жирных кислот.

В связи с тем, что физико-химическое состояние мембраны влияет на биологические свойства микроорганизмов, оценивали способность бифидобактерий к образованию биопленок. Процесс биопленкообразования является многоступенчатым, поэтому исследовали биологические свойства бифидобактерий на каждом из этапов образования биопленок. До взаимодействия с липазами золотистых стафилококков культура *B. breve* характеризовалась высокой гидрофобностью, высокой адгезивной активностью и высокой способностью к аутоагглютинации (Таблица 1).

После обработки штамма липолитическими ферментами аутоагглютинация снизилась в 2 раза, гидрофобность в 1,5 раза, адгезивная активность изменилась незначительно и составила 3,9 ($\chi^2=7,1$, $df=2$, $p=0,023$). Интактные культуры *B. bifidum* и *B.longum* имели средние показатели гидрофобности и аутоагглютинации, низкую способность к специфической адгезии. После обработки *B.bifidum* и *B.longum* экзометаболитами стафилококка аутоагглютинация, гидрофобность, адгезивная способность культур статистически значимо не изменялись ($\chi^2 =4,9$, $df=2$, $p=0,21$) и ($\chi^2 =2,9$, $df=2$, $p=0,1$).

Обсуждение

Изменение состава фосфолипидов является эволюционным ответом микроорганизмов на физические и химические изменения в окружающей среде, своеобразной адаптацией, которая включается в период роста бактерий [8, 9, 10]. Однако механизмы гомеостатической адаптации у разных микроорганизмов отличаются. Преобладающей реакцией многих бактерий на внешние воздействия является модификация ацильной цепи липидных структур за счет изменения соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот [2, 10]. Также описаны механизмы сокращения или удлинения цепи, изменения в соотношении разветвленных жирных кислот, рост-зависимое метилирование или насыщение циклопропаном, а также цис- транс- изомеризационное преобразование двойных связей (π – диастереометрия) [3, 14]. Вид и степень реакции по изменению состояния мембраны определяют длительность взаимодействия доминантных и ассоциативных микросимбионтов, что наиболее актуально для определения механизмов персистенции резидентов в различных биотопах.

Бифидобактерии являются доминирующими микроорганизмами среди кишечной микрофлоры. Они контролируют качественный и количественный состав сообщества, предотвращают избыточный рост условно-патогенных бактерий [15]. В многочисленном и сложном сообществе кишечника бифидобактерии

постоянно взаимодействуют с индигенными, условно-патогенными или патогенными микроорганизмами и их метаболитами [16, 17, 18]. При этом микробиологическая система кишечника очень долго может сохраняться в стабильном состоянии. В основе лежит способность резидентов оперативно реагировать на прямые или опосредованные воздействия ассоциативных микросимбионтов изменением своих биологических свойств [15, 17].

Исследования показали, что жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов бифидобактерий характеризовался видоспецифичностью, что подтверждает ранее установленные данные о возможности исследования микробиоценозов или отдельных микросимбионтов с помощью ГХ-МС без выделения чистых культур [1, 2]. Кроме видовых особенностей путей синтеза жирных кислот их состав зависит и от микроокружения, т.е. от наличия органических липофильных соединений микробного происхождения, разветвленных короткоцепочечных карбоновых кислот и других метаболитов [3, 14]. В связи с этим клеточная мембрана резидентов кишечного микробиоценоза в целом может быть индикатором наличия ассоциативных микросимбионтов, продуцирующих липофильные экзометаболиты, например, стафилококков.

Изначально, до обработки *B. breve* липолитическими ферментами стафилококка, в состав фосфолипидов мембраны входило большое количество ненасыщенных (олеиновая, линолевая) и разветвленных жирных кислот (изоформы), присутствие которых увеличивает текучесть данной оболочки микроорганизмов и способствует формированию высокой гидрофобности и аутоагглютинации [5, 6, 19].

После воздействия экзометаболитов стафилококка у *B. breve* отмечали повышение содержания жирных кислот с насыщенной ацильной цепью, снижение их разнообразия за счет прекращения синтеза длинноцепочечных кислот, таких как эйкозановая, докозановая, тетракозановая и докозановая кислота, и уменьшение массы среднецепочечных жирных кислот. В составе фосфолипидов мембраны изменялось соотношение масс ненасыщенных и насыщенных жирных кислот с 2 : 1 до воздействия экзометаболитов стафилококков до 1 : 9 - после воздействия. Таким образом, мембрана *B. breve* после взаимодействия с метаболитами стафилококка становится менее текучей и

более ригидной. Изменялись и биологические свойства штамма – аутоагглютинация снижалась в 2 раза, гидрофобность в 1,5 раза. Возможно, изменение жидко-кристаллического состояния мембраны у *B. breve* предупреждает воздействие на оболочку мембранотоксинов и низкомолекулярных пептидов, выделяемых ассоциативными микросимбионтами и способствует сохранению определенной плотности бактериальной популяции. С другой стороны, снижение текучести мембраны снижает стрессоустойчивость бактерий, что дает возможность предполагать, что данный механизм гомеофазовой адаптации имеет свои преимущества до определенного предела.

Интактная цитоплазматическая мембрана у *B. bifidum* и *B. longum* содержала большое количество насыщенных жирных кислот (стеариновой, пальмитиновой), т.е. изначально она отличалась ригидностью к действию ферментов стафилококков. Данные виды бифидобактерий имели средние показатели гидрофобности и аутоагглютинации. После воздействия на них липаз стафилококка количественный состав жирных кислот практически не менялся, но в составе фосфолипидов появлялись жирные кислоты с длинными цепями (эйкозановая, докозановая и тетракозановая). Кроме того, у *B. bifidum* увеличивалась масса метилированных жирных кислот. При этом биологические свойства, определяющие способность бактерий к биопленкообразованию, у *B. bifidum* и *B. longum* не изменялись. С «естественной» устойчивостью *B. bifidum* и *B. longum* к действию экзометаболитов ассоциативных микросимбионтов, вероятно, связана более высокая распространенность персистенции данных видов в кишечном микросимбиоценозе у населения и их доминирование в структуре бифидофлоры у разных возрастных групп [20].

Заключение

Таким образом, высокое содержание насыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов цитоплазматической мембраны у *B. bifidum* и *B. longum* обуславливает ригидность этой оболочки к действию экзометаболитов *S. aureus* с липолитической активностью. У *B. breve* происходит регулирование текучести мембраны при действии метаболитов стафилококков за счет уменьшения разнообразия и изменения соотношения масс ненасыщенных и насыщенных жирных кислот. По-

лученные результаты раскрывают некоторые механизмы формирования и функционирования кишечного нормобиоценоза и могут быть использованы для поиска и разработки способов модификации биологических свойств доминантных микросимбионтов с целью повышения эффективности методов коррекции дисбиотических нарушений. ●

Литература / References:

1. Beloborodova NV, Bairamov IT, Olenin AYU, Fedotcheva NI. Exometabolites of some anaerobic microorganisms of human microflora. *Biomedical Chemistry*. 2011; 57 (1): 95-105. Russian (Белобородова Н.В., Байрамов И.Т., Оленин А.Ю., Федотчева Н.И. Экзометаболиты некоторых анаэробных микроорганизмов микрофлоры человека // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57, № 1. С. 95-105).
2. Budnikov GK. *Chemical Analysis in Medical Diagnostics*. – Moscow: Science, 2010. 504 p. Russian (Будников Г.К. Химический анализ в медицинской диагностике. Москва: Наука, 2010. 504 с.)
3. Titov VN, Lisitsyn DM. *Fatty acids. Physical chemistry, biology, and medicine*. М. – Tver': Triada Publishing, 2006. 672 p. Russian (Титов В.Н., Лисицын Д.М. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина. Москва-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. 672 с.)
4. Schneider R, Toulmay A. The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 73 (6): 1224-1232.
5. Gleinser M, Grimm V, Zhurina D, Yuan J, Riedel CU. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. *Microb. Cell Fact.* 2012; 11: 80.
6. Wang LQ, Meng XCh, Zhang BR, Wang Y, Shang YL. Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria. *World J. of microbiology and biotechnology*. 2010; 26 (11): 1999-2007.
7. Reis A, Spickett CM. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1818 (10): 2374-2387.
8. Ianutsevich EA, Danilova OV, Groza NV, Tereshina VM. Membrane lipids and cytosol carbohydrates in *Aspergillus niger* under osmotic, oxidative, and cold impact. *Microbiology*. 2016; 85 (1): 283-292. Russian (Януцевич Е.А., Данилова О.В., Гроза Н.В., Терешина В.М. Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического, окислительного и холодового воздействий // Микробиология. 2016. Т.85, № 1. С. 283-292).
9. To TM, Grandvalet C, Tourdot-Marechall R. Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential to the acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (10): 3327-3334.
10. Härtig C, Löffhagen N, Harms H. Formation of trans Fatty Acids Is Not Involved in Growth-Linked Membrane Adaptation of *Pseudomonas putida* *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(4): 1915-1922.
11. Benamara H, Rihouey Ch, Jouenne T, Alexandre S. Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1808 (1): 98-105.
12. Leonov VV, Kurlovich NA, Sokolova TN. The relation of the hydrophobicity index of microbial cells to their ability to form biofilms. *Biophysics*. 2014; 59 (6): 1131-1134. Russian (Леонов В.В., Курлович Н.А., Соколова Т.Н. Связь показателя гидрофобности микробных клеток с их биопленкообразующей способностью // Биофизика. 2014. Т.59, №6. С.1131-1134).
13. Brilis VI, Briline TA, Lentsner KhP, Lentsner AA. Method for investigation of microorganism adhesion. *Laboratory Work*. 1986; (4): 210-212. Russian (Брилис В.И., Брилине Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. 1986. №4. С. 210-212).
14. Bissvanger H. *Practical enzymology*. М: Binom, 2010. 328 p. Russian (Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: Бином, 2010. 328 с.)
15. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV. Interaction of *Bifidobacterium bifidum* with normal microflora in mikrosymbiogenesis of human gut. *Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology*. 2012; (4): 51-56. Russian (Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Взаимодействие *Bifidobacterium bifidum* с представителями нормальной микрофлоры в микросимбиозе кишечника человека // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. №4. С.51-56).
16. Rios-Covian D, Arbolea S, Hernandez-Barranco AM, Alvares-Buylla JR, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M et al. Interactions between *Bifidobacterium* and *Bacteroides* species in cofermentations are affected by carbon sources, including exopolysaccharides produced by *Bifidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79 (23): 7518-7524.
17. Mayansky AN, Chebotar IV, Evteeva NI, Rudneva EI. Interspecies interaction of bacteria and the formation of mixed (polymicrobial) biofilm. *Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology*. 2012; (1): 93-101. Russian (Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Евтеева Н.И., Руднева Е.И. Межвидовое взаимодействие бактерий и образование смешанной (полимикробной) биопленки // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. №1. С. 93-101).
18. Zakharova YuV, Levanova LA. HIV-infected children's intestine microbiocenosis condition. *Medicine in Kuzbass*. 2015; (4): 29-33. Russian (Захарова Ю.В., Леванова Л.А. Состояние микробиоценоза кишечника у ВИЧ-инфицированных детей // Медицина в Кузбассе. 2015. №4. С. 29-33).
19. Zakharova YuV, Sukhikh AS. Chromatographic analyses of membrane fatty acid *Bifidobacterium* with different hydrophobicity. *Sorption and Chromatographic Processes*. 2015; (6): 280-287. Russian (Захарова Ю.В., Сухих А.С. Хроматографический анализ жирных кислот клеточных стенок бифидобактерий с различной гидрофобностью // Сорбционные и хроматографические процессы. 2015. №6. С. 280-287).
20. Ivanova EV, Perunova NB, Valyshev AV, Valysheva IV, Bukharin OV. Species characteristic and factors of persistence of gut bifidoflora during healthy state and dysbiosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology*. 2009; (2): 89-93. Russian (Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Вальшев А.В., Вальшева И.В., Бухарин О.В. Видовая характеристика и факторы персистенции бифидофлоры кишечника в норме и при дисбиозах // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. №2. С. 89-93).

Сведения об авторах

Захарова Юлия Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: выделение бифидобактерий, идентификация, изучение биологических свойств, получение экзометаболических стафилококков, статистическая обработка данных, написание статьи.

Отдушкина Лариса Юрьевна, ассистент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: выделение стафилококков, идентификация, подготовка чистых культур стафилококков для постановки основного опыта.

Леванова Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: организация забора и доставки исследуемого материала, организация и участие в проведении бактериологических исследований, консультативная помощь, оформление статьи.

Сухих Андрей Сергеевич, кандидат фармацевтических наук, доцент, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: пробоподготовка образцов к проведению ГХ-МС, организация хроматографического анализа, проведение спектрофотометрии экзометаболических стафилококков

Authors

Dr. Yuliya V. Zakharova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: performed the microbiology experiments and wrote the manuscript.

Dr. Larisa Y. Otdushkina, MD, Assistant Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: performed the microbiology experiments and wrote the manuscript.

Prof. Lyudmila A. Levanova, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

Dr. Andrey S. Sukhikh, MD, PhD, Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: performed gas chromatography-mass spectrometry.

Acknowledgements: There was no funding for this project.

Корреспонденцию адресовать:

Захарова Юлия Викторовна
650056, Кемерово, ул. Ворошилова 22а,
E-mail: yvz@bk.ru

Corresponding author:

Dr. Yuliya V. Zakharova,
Voroshilova Street 22a, Kemerovo, 650056,
Russian Federation
E-mail: yvz@bk.ru

Статья поступила: 02.12.16г.

Принята в печать: 18. 01.17г.