БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.264

А.В. Семенов

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения РАН (г. Оренбург)*

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *Staphylococcus aureus* ПРИ МЕЖМИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

Работа выполнена в рамках тем НИР ИКВС УрО РАН «Изучение механизмов взаимоотношений симбионтов и их регуляции в различных биологических системах» (№ гос. регистрации 0120.0 600145) и «Формирование и функционирование микробных симбиозов в живых системах» (№ гос. регистрации 01201067427).

Материалы опубликованы в рамках проекта ФЦП «Организационно-техническое обеспечение проведения Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (ГК № 14.741.12.0153 от 07 июня 2011 г.).

*На примере антагонистической активности *S. aureus* показано, что биологические свойства бактерий могут изменяться в условиях межмикробных отношений, при взаимодействии с ассоциативными микроорганизмами, которые действуют по направлениям: индифферентное, стимулирующее, ингибирующее и инвертирующее. Эффекторами регуляции выступают метаболиты и фрагменты клеточных стенок ассоциантов. Способность регулировать межмикробные отношения в системе «прокариот – прокариот» является новым свойством фрагментов клеточных бактерий и грибов. Изменение антагонизма осуществляется за счет регуляции продукции и/или активности антимикробных веществ, например лизоцима. Полученные результаты обосновывают положение, что антагонистическая активность штамма – результат межмикробных отношений, при которых возможность и выраженность продукции антимикробных веществ активным штаммом определяются ассоциативными микроорганизмами.*

Обсуждается роль ассоциативных микроорганизмов в процессах формирования и функционирования микробиоценозов. В частности, предложен новый механизм колонизационной резистентности микробного сообщества – снижение колонизационного потенциала аллохтонных микроорганизмов. Микробные ингибиторы факторов колонизации патогенных микроорганизмов перспективны для разработки новых противоинфекционных препаратов.

Ключевые слова: экология микроорганизмов; межмикробные отношения; антагонизм; колонизация; колонизационная резистентность; клеточная стенка.

Введение

В природе бактерии обитают не обособленно, а в окружении других микроорганизмов, поэтому их свойства могут отличаться от наблюдаемых в чистых

культурах, что диктует необходимость исследования свойств микроорганизмов в условиях межмикробных отношений. Антагонизм – тип симбиотических отношений между организмами, в результате которых один из участников взаимодействий (антагонист) получает селективное преимущество в борьбе за выживание за счет конкурентных свойств: высокие ростовые и адаптационные возможности, продукция антибиотических веществ. Антагонистические свойства бактерий – один из механизмов формирования и функционирования микробного сообщества, не являются исключением и микробиоценозы человека [1].

Ранее нами была показана потенциальная роль окружающих ассоциативных микроорганизмов (АМ) в функционировании сообщества, в частности в выполнении им защитной функции, заключающаяся в стимуляции ростовых и антимикробных свойств доминантных бактерий [2–4]. Представляет интерес изучение роли АМ при формировании микробиоценоза, в частности при колонизации биотопа аллохтонными микроорганизмами.

К микроорганизмам, обладающим высоким колонизационным потенциалом, относятся представители рода *Staphylococcus* sp., которые широко распространены в природе, особенно на поверхности тела теплокровных животных и человека, обладают широким спектром факторов колонизации – адгезинами и антагонистической активностью (АА), а также высокой выживаемостью за счет наличия прочной клеточной стенки, факторов персистенции, выраженной способности к биопленкообразованию и др. [5, 6]. Типовой вид – *Staphylococcus aureus* [7]. Как правило, патогенные бактерии, к которым относится и золотистый стафилококк, являются аллохтонными для микробиоценозов макроорганизма. Таким образом, *S. aureus* является удобным объектом для исследования изменения колонизационного потенциала микроорганизмов в условиях межмикробных отношений и изучения роли АМ в формировании микробиоценоза.

Цель исследования – изучить антагонистическую активность и продукцию антимикробных веществ *Staphylococcus aureus* при межмикробных взаимодействиях.

Материалы и методики исследования

В работе использовали микроорганизмы, выделенные из различных биотопов человека. Штамм-антагонист *S. aureus* (колонизатор) выделен с кожи рук бактерионосителя, остальные микроорганизмы – из женского репродуктивного тракта, включая штаммы-ассоцианты *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *S. hominis*, *Corynebacterium minutissimum*, *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacae* и *Candida albicans*, индикаторные тест-культуры *L. acidophilus*, *L. casei* и *S. hominis* (чувствительность была определена в серии предварительных экспериментов).

Идентификацию бактерий проводили общепринятыми методами по Берджи [7], с использованием тест-систем Api («Bio Merieux», Франция) и дифференциально-диагностической среды для кандид Nickerson (Bi.G.G.Y – agar, «HiMedia», Индия).

Культивирование лактобацилл и кандид проводили в микроаэрофильных условиях при 37°C, 20–24 ч, на среде Манна–Рогоза–Шарпа («HiMedia», Ин-

дия), остальных микроорганизмов – в аэробных условиях при 37°C, 20–24 ч, в 1,5%-ной пептонной воде, на основе гидролизата рыбной муки («Питательные среды», Россия).

Для моделирования межмикробных отношений в системе «штамм-антагонист *S. aureus* – штамм-ассоциант» использовали оригинальный метод [8], основанный на тестировании антимикробной активности исследуемого антагониста, обработанного метаболитами и пептидогликаном клеточных стенок культуры-ассоцианта. Антагонизм клеточных компонентов ассоциативных микроорганизмов исключали. Метаболиты получали центрифугированием культуральной жидкости при 3000g 20 мин, стерилизовали фильтрованием (0,30 мкм, «Millipore», США). Пептидогликан клеточных стенок бактерий получали по Герхардту с дополнениями [2, 9], стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм 30 мин. Аналогичным способом готовили и фрагменты клеточных стенок *C. albicans*. При получении пептидогликана из клеточных стенок грамотрицательных энтеробактеров перед всеми операциями биомассу бактерий обрабатывали горячим (65°C) 10%-ным водным раствором фенола для удаления липополисахарида. Исследование традиционными методами газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографией состава образцов пептидогликана показало содержание нетипичных (согласно [10]) для клеточных стенок данного вида микроорганизма аминокислот и нейтральных углеводов по 0–3,0% (по массе) и отсутствие жирных кислот, что говорит о достаточной чистоте препарата. В работе использовали количество фрагментов клеточных стенок ассоцианта, равное оптической плотности бульонной культуры.

Антагонистическую активность выражали в процентах угнетения прироста КОЕ индикаторной культуры при инкубации с метаболитами антагониста, по сравнению с приростом КОЕ культуры при влиянии среды роста антагониста.

Влияние ассоциантов на ростовые свойства антагониста оценивали по приросту оптической плотности (ОП) его бульонной культуры, измеренной при 492 нм (фотометр Multiscan Ascent («Thermo Labsystems», ЕС)) в стандартных 96-луночных планшетах и выражали в процентах прироста ОП культуры при инкубации с клеточными компонентами ассоцианта, по сравнению с приростом ОП культуры при влиянии среды роста ассоцианта.

Для оценки изменения количества и/или активности конкретного антимикробного фактора параллельно антагонизму исследовали активность литических ферментов β -гликозидаз – лизоцима и аминидазы.

Определение общей β -гликозидазной активности бактерий проводили с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты [11] по увеличению количества восстанавливающих сахаров при гидролизе субстрата – клеточных стенок микроорганизмов (в работе *Micrococcus luteus* №2665 ГИСК им. Л.А. Тарасевича, калибровка по глюкозе). Определение β -N-ацетилглюкозаминидазной активности бактерий (КФ 3.1.2.52) проводили микрометодом в 96-луночных планшетах с использованием хромогенного субстрата N-ацетилглюкозамина, меченого по β -1,4-гликозидной связи паранитрофенолом на фотометре с длиной волны 540 нм [12]. Наличие у штамма лизоцимной активности (КФ 3.1.2.17) диагностировали в случае положительной реакции на β -гликозидазную активность на фоне отсутствия активности аминидазы. Фермент-

ную активность выражали в мкмоль продукта, образующегося за 1 час инкубации при 37°C в 0,025М натрий-калий-фосфатном буфере (рН=6,2) субстрата с культуральной жидкостью исследуемой культуры, в пересчете на 1 мл (мкмоль/ч·мл). Реактивы «Sigma-Aldrich» и «Реахим» (Россия).

Результаты представлены в виде средней арифметической и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$), которые обрабатывали с использованием *U*-критерия Манна–Уитни [13]. Различие между выборками считали достоверным при отвержении нулевой гипотезы на уровне статистической значимости $p < 0,05$. Существенных отличий между данными, полученных в серии повторных экспериментов, не обнаружено.

Результаты исследования и обсуждение

На примере АА *S. aureus* показано, что биологические свойства микроорганизмов могут изменяться в условиях межмикробных отношений по направлениям: индифферентное, стимулирующее, ингибирующее и инвертирующее. Инверсия означает замену антагонизма на стимуляцию роста. Эффекторами регуляции выступают метаболиты и фрагменты клеточных стенок АМ. Изменение активности не было связано с совокупным действием антимикробных веществ ассоцианта и исследуемой культуры антагониста.

Изученные микроорганизмы обладали, в основном, способностью ингибировать и инвертировать проявление антагонизма (см. таблицу). Наиболее ярко данная способность проявлялась у *S. hominis*. Так, например, ассоциативный стафилококк инвертировал антагонизм *S. aureus* в отношении *L. casei* с $58 \pm 3\%$ в контроле до $-20 \pm 2\%$ при действии метаболитов и до $-180 \pm 20\%$ при влиянии пептидогликана в опыте, а в отношении *L. acidophilus* – с $76 \pm 1\%$ до $-119 \pm 58\%$ при действии метаболитов и до $-60 \pm 5\%$ при влиянии пептидогликана *S. hominis* (для всех $p < 0,05$). Отрицательные значения признака означали полное ингибирование АА с заменой на стимуляцию роста тест-культуры (инвертирование антагонизма), таким образом, значение активности -20% следует расценивать как стимуляцию роста на 20% .

Наибольшее ростстимулирующее действие антагониста *S. aureus*, в результате инверсии антагонизма, наблюдали в отношении лактобактерий, особенно при действии на золотистый стафилококк метаболитов бактерий-ассоциантов. Однако действие их пептидогликанов в ряде случаев приводило к повышению АА *S. aureus* в отношении изученных лактобацилл. Данный факт демонстрирует, что АМ из-за различного действия их клеточных компонентов могут оказывать различное влияние на свойства антагониста. Например, метаболиты *C. minutissimum* и *L. casei* ингибировали антагонизм *S. aureus* в отношении индикаторных лактобацилл, а пептидогликаны – стимулировали. Вопрос о том, какой эффект и в каких условиях будет преобладать при совместном их действии, остается открытым.

На данном этапе работы были исследованы общие модулирующие свойства штамма-ассоцианта. Также наблюдали, что действие (стимулирование, инверсия и др.) одних и тех же клеточных компонентов АМ может быть различным в зависимости от вида тест-культур. Например, метаболиты *E. ag-*

glomerans инвертировали антагонизм *S. aureus* в отношении *L. acidophilus*, ингибировали в отношении *S. hominis*, а в отношении *L. casei* обладали индифферентным эффектом.

Влияние ассоциативных микроорганизмов различных таксонов на антагонистическую активность *Staphylococcus aureus*

Ассоциативные микроорганизмы	Вид КК ^а	Индикаторные культуры			Лизоцимная активность, мкмоль/ч·мл
		<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. hominis</i>	1280 ± 20 (контроль)
<i>L. casei</i>	М	–	–	И	– ^б
	КС ^б	+	+	0	
<i>E. faecalis</i>	М	И	И	0	1120±80, (p>0,05)
	ПГ	–	+	+	1280±44, (p>0,05)
<i>S. hominis</i>	М	И	И	И	680±24
	ПГ	И	И	0	1000±5
<i>C. minutissimum</i>	М	–	–	И	640±15
	ПГ	+	+	0	1520±10
<i>E. agglomerans</i>	М	И	0	–	80±28
	ПГ	–	0	0	720±36
<i>E. cloacae</i>	М	И	И	–	1040±120, (p>0,05)
	ПГ	И	0	И	840±20
<i>C. albicans</i>	М	+	+	+	– ^б
	КС	0	0	–	

Примечание. ^а – КК – вид клеточного компонента: метаболиты (М), пептидогликан (ПГ) и КС (клеточные стенки). Действие на антагонизм штамма-антагониста: «0» – индифферентное, «+» – стимулирующее, «–» – ингибирующее, «И» – инвертирующее; ^б – обнаружено большое содержание нейтральных углеводов, что не позволило считать образец пептидогликаном, анализ КС грибов не проводили; ^в – лизоцимная активность не определена, так как в культуральной жидкости данных ассоциантов содержалось большое количество восстанавливающих сахаров (глюкоза МРС-среды), препятствующих анализу. Все изменения антагонистической и лизоцимной активностей статистически значимо (p<0,05) отличались от контрольных значений, за исключением указанных случаев (p>0,05).

При исследовании антагонистических отношений в ассоциации из близкородственных бактерий установлено, что регуляции в условиях межмикробных отношений подвержен не только межродовой, но и внутривидовой антагонизм. На примере отношений между антагонистом *S. aureus* и тест-культурой *S. hominis* показано, что АА золотистого стафилококка снижается, вплоть до инверсии, после его обработки клеточными компонентами изученных АМ, особенно их метаболитами (см. таблицу). Например, активность *S. aureus* в контроле составила 30±6%, при действии *L. casei* наблюдали инвертирование признака до –182±15%, *C. minutissimum* – до –2±0,5%, и самого *S. hominis* – до –60±2%. *E. agglomerans* и *E. cloacae* – снижали до 5±2% и 14,75±1,25%, соответственно (для всех p<0,05). Проявление близкородственного антагонизма *S. aureus* стимулировали *E. faecalis* – до 51±2% и *C. albicans* – до 63±4% (p<0,05), причем данный эффект у энтерококка опосредовали фрагменты пептидогликана, а у гриба – метаболиты.

Таким образом, показано, что антагонизм бактерий может изменяться в условиях межмикробных отношений. Эффект регуляции АА зависел от видовых особенностей штамма-ассоцианта и индикаторной культуры.

Для объяснения наблюдаемых эффектов необходимо изучение механизма регуляции антагонизма. Одним из таких механизмов может быть изменение продукции / активности антимикробных веществ, и, учитывая, что АА исследуемого *S. aureus* регулировали фрагменты клеточных стенок АМ, то, вероятно, происходило изменение продукции / активности литических ферментов антагониста.

В настоящем исследовании у *S. aureus* статистически значимо выявляли только β -гликозидазную активность на фоне отсутствия β -N-ацетилглюкозаминидазной активности, что позволило диагностировать у стафилококка наличие лизоцимной активности (см. таблицу). *S. aureus* реагировал почти на все клеточные компоненты снижением лизоцимной активности. Наименьшие значения активности наблюдали после обработки стафилококка метаболитами *S. hominis*, *C. minutissimum* и *E. agglomerans*, что совпадало с уменьшением антагонизма в отношении всех изученных тест-культур. Повышение лизоцимной активности отмечено только в одном случае – при действии пептидогликана коринебактерии, параллельно этому наблюдали увеличение АА в отношении лактобацилл.

Таким образом, на примере регуляции лизоцимной активности антагониста показано, что ассоцианты могут по-разному действовать на одну мишень, а также иметь различные мишени при регуляции антагонизма активных штаммов, что может объяснить наличие у ассоциативного микроорганизма разнообразных типов влияния на АА бактерий. Установлено, что регуляция АА может осуществляться за счет регуляции продукции антимикробных веществ.

Механизмы микробной регуляции АА бактерий могут быть разнообразными. К усилению антагонистических свойств культуры могут приводить условия улучшения её метаболических и ростовых характеристик [14]. Изученные микроорганизмы в основном оказывали индифферентное влияние на рост антагониста, за исключением *C. albicans*, метаболиты которого стимулировали прирост *S. aureus*, в среднем на $24 \pm 1\%$ ($p < 0,05$). Вероятно, именно с увеличением биомассы антагониста связано повышение АА стафилококка в отношении изученных тест-культур. Повышение антагонизма возможно и при действии специфических индукторов, запускающих синтез антимикробных веществ [15–19]. Не исключено синергидное действие антимикробных веществ антагониста и ассоцианта [20–21]. Однако в настоящей работе антагонизм клеточных компонентов ассоциантов исключали. Напротив, при добавлении метаболитов ассоцианта к культуральной жидкости антагониста наблюдали, что АА смеси метаболитов была на уровне либо ниже активности целевой культуральной жидкости антагониста, что, скорее всего, связано с разбавлением последней, но нельзя исключить инактивации антимикробных факторов активного штамма [22]. Ингибирование антагонизма также может быть связано с отрицательным влиянием ассоцианта на метаболизм антагониста, например за счет его антимикробных веществ. Среди изученных АМ только штамм *L. casei* задерживал рост *S. aureus*, что, вероятно, и стало причиной снижения его АА.

В случае микробной регуляции внутривидового антагонизма, обусловленного, вероятно, бактериоцинами, ингибирование признака можно объяснить интерферирующим действием регуляторных молекул или действием ферментов АМ, разрушающих индукторы их синтеза [23, 24].

В случае микробной регуляции антагонизма, обусловленного β -гликозидазами, механизм повышения активности антагониста, вероятно, связан с индукцией / стимуляцией продукции или экспрессии генов синтеза литических ферментов [25]. Механизм снижения лизоцимной активности может быть обусловлен репрессией генов синтеза β -гликозидаз [26], инактивацией фермента метаболитами бактерий-регуляторов [27–29] или липидными фрагментами их мембран и клеточных стенок [30]. Не исключено ингибирование фермента по конкурентному типу при действии продуктов распада пептидогликана или фрагментов хитина клеточных стенок кандид. Следует отметить, что снижение / инверсия АА стафилококка под действием некоторых АМ не сопровождалась снижением лизоцимной активности, что свидетельствует о наличии других механизмов регуляции антагонизма, связанных не только с синтезом и активностью литических ферментов. Обнаруженные эффекты по ингибированию микроорганизмами бактериального лизоцима демонстрируют возможность участия антилизоцимного фактора в межмикробных отношениях, о котором хорошо известно как о факторе выживания микроорганизмов в условиях макроорганизма [1, 3, 31, 32]. Также данные по ингибированию активности литических ферментов и других антимикробных веществ могут объяснить инвертирование антагонизма. Известно ростостимулирующее действие низких концентраций антибиотиков и лизоцима [31, 33], которые могли создаваться в результате ингибирующего влияния АМ.

Обсуждение роли фрагментов клеточных стенок микроорганизмов (ФКСМ) в межмикробных отношениях заслуживает отдельного внимания. Классическими являются представления о бактериальном пептидогликане и фрагментах клеточных стенок грибов как об основополагающей структуре, определяющей исход взаимоотношений между микроорганизмом и макроорганизмом, преимущественно в рамках «паразит – хозяин» [32, 34]. Однако о значении ФКСМ в межмикробных отношениях известно значительно меньше. Установлена роль ФКСМ при реализации антагонизма в системах «эукариот – эукариот», в частности между грибами [25, 35], и «эукариот – прокариот», например, между грибами и бактериями [12, 36], водорослями и бактериями [37]. Однако о значении фрагментов клеточных стенок бактерий и грибов в реализации антагонистических взаимодействий между бактериями, прокариотами, данные отсутствуют, несмотря на то что известно о стимуляции продукции лизина у микроорганизмов при действии микробных клеточных стенок [12, 18, 38]. Следует отметить, что ФКСМ могут являться медиатором не только отрицательных отношений (антагонизм, паразитизм), но и положительных (комменсализм, мутуализм). Например, описано стимулирующее действие бактериального пептидогликана на ростовые свойства микроорганизмов [4, 39, 40].

Полученные данные позволяют установить для ФКСМ наличие нового свойства – способности регулировать межмикробные отношения в системе «прокариот – прокариот».

Оценивая значение микробной регуляции биологических свойств бактерий, в частности их АА, можно заключить, что АМ могут играть активную роль в процессах формирования и функционирования микробиоценозов. Так, например, наличие в сообществе кандид-ассоциантов может способствовать колонизации биотопа аллохтонным *S. aureus* за счет стимуляции его АА в отношении автохтонных лактобацилл – доминантных представителей вагинального биотопа, что будет способствовать формированию нового сообщества. Также полученные данные демонстрируют ещё один механизм колонизационной резистентности, иначе – защитной функции микробиоценоза. Помимо стимуляции антагонизма автохтонной микрофлоры, это ингибирование АА аллохтонных микроорганизмов в отношении автохтонных. В частности, наличие в сообществе стафилококков и энтеробактеров может способствовать снижению колонизационного потенциала *S. aureus*.

Заключение

На примере антагонистической активности *Staphylococcus aureus* показано, что биологические свойства бактерий могут изменяться в условиях межмикробных отношений при взаимодействии с ассоциативными микроорганизмами, которые действуют по направлениям: индифферентное, стимулирующее, ингибирующее и инвертирующее. Эффекторами регуляции выступают метаболиты и фрагменты клеточных стенок ассоциантов. Способность регулировать межмикробные отношения в системе «прокариот – прокариот» является новым свойством фрагментов клеточных стенок микроорганизмов.

Микробной регуляции подвержен внутривидовой и межвидовой антагонизм. Изменение антагонизма осуществляется за счет регуляции продукции антимикробных веществ, в частности литических ферментов.

Полученные результаты позволяют рассматривать АА штамма не только как способность одного вида микроба подавлять развитие других микроорганизмов, но и как результат межмикробных отношений, при которых возможность и выраженность продукции антимикробных веществ активным штаммом определяются ассоциативными микроорганизмами.

Настоящие результаты в совокупности с полученными ранее данными по микробной регуляции АА микроорганизмов демонстрируют двойственную роль АМ: с одной стороны, могут повышать колонизационную резистентность биотопа путем усиления АА автохтонных бактерий в отношении аллохтонных и снижения АА аллохтонных микроорганизмов в отношении автохтонных, а с другой стороны, напротив, могут повышать колонизационный потенциал аллохтонных микроорганизмов путем повышения их АА в отношении автохтонных бактерий.

Микробные ингибиторы факторов колонизации патогенных микроорганизмов перспективны для разработки новых противомикробных препаратов.

Автор выражает благодарность сотрудникам Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов): кандидату биологических наук М.П. Чернышовой и кандидату биологических наук Н.Ю. Селиванову за помощь в проведении химического анализа пептидогликана клеточных стенок бактерий.

Литература

1. Бухарин О.В., Вальшиев А.В., Гильмутдинова Ф.Г., Черкасов С.В. Экология микроорганизмов человека. Екатеринбург : УрО РАН, 2006. 546 с.
2. Семёнов А.В., Сгибнев А.В., Черкасов С.В., Бухарин О.В. Микробная регуляция антагонистической активности бактерий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. № 11. С. 545–548.
3. Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз человека (на модели репродуктивного тракта женщин) // Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург : УрО РАН, 2007. 264 с.
4. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. 2010. Т. 12, № 4. С. 347–352.
5. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург : УрО РАН, 2000. 240 с.
6. Kloos W., Bannerman T. Update on clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci* // Clin. Microbiol. Rev. 1994. Vol. 7. P. 117–140.
7. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / пер. с англ. М. : Мир, 1984.
8. 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. Бюл. № 35.
9. Методы общей бактериологии : в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта и др. М. : Мир, 1984. Т. 2. 472 с.
10. Schleifer K., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // Bacteriol. Rev. 1972. Vol. 36, № 4. P. 407–477.
11. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. 1959. № 31. P. 426–428.
12. Fermor T., Wood D., Lincoln S., Fenlon J. Bacteriolysis by *Agaricus bisporus* // Journal Gen. Microbiol. 1991. № 130. P. 761–769.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. М. : Высшая школа, 1990. 352 с.
14. Экологическая роль микробных метаболитов / отв. ред. Д.Г. Звягинцев. М. : МГУ, 1986. 240 с.
15. Хохлов А.С. Низкомолекулярные ауторегуляторы развития микроорганизмов. М. : Наука, 1988. 306 с.
16. Dubuis C., Haas D. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in *Pseudomonads* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, № 21. P. 650–654.
17. Kleerebezem M., Quadri L., Kuipers O., de Vos W. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction system in gram-positive bacteria // Mol. Microbiol. 1997. № 24. P. 895–904.
18. Barefoot S. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B // Appl. Environ. Microbiol. 1994. Vol. 60, № 10. P. 3522–3528.
19. Bronneke V., Fiedler F. Production of bacteriolytic enzymes by *Streptomyces globisporus* regulated by exogenous bacterial cell walls // Appl. Environ. Microbiol. 1994. Vol. 60, № 3. P. 785–791.
20. Nykanen A., Vesanen S., Kallio H. Synergistic antimicrobial effect of nisin whey permeate and lactic acid on microbes isolated from fish // Journal Appl. Microbiol. 1998. № 27. P. 345–348.
21. Lorito M., Di Pietro A., Hayes C. et al. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae* // Phytopathology. 1993. № 83. P. 721–728.
22. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. 2004. № 44. С. 263–306.

23. *Taga M., Bassler B.* Chemical communication among bacteria // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. № 100. P. 14549–14554.
24. *Rasmussen T., Givskov M.* Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects // Microbiology. 2006. № 152. P. 895–904.
25. *Haran S., Schickler H., Chet I.* Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the bio-control activity of *Trichoderma harzianum* // Microbiology. 1996. № 142. P. 2321–2331.
26. *Lutz M., Feichtinger G., Defago G., Duffy B.* Mycotoxigenic fusarium and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1 // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69, № 6. P. 3077–3084.
27. *Бухарин О.В., Усвьяцов Б.Я.* Антилизозимный тест как маркер персистенции микроорганизмов // Теоретическая и прикладная инфекционная иммунология. М. : Медицина, 1982. С. 87–88.
28. *Monchois V., Aberge C., Sturgis J.* *Escherichia coli* ykfE ORF an gene encodes a potent inhibitor of C-type lysozyme // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 21. P. 18437–18441.
29. *Nakimbugwe D., Masschalck B., Deckers D.* Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts // FEMS Microbiol. Lett. 2006. № 259. P. 41–46.
30. *Захарова И.Я., Павлова И.Н.* Литические ферменты микроорганизмов. Киев : Наук. думка, 1985. 215 с.
31. *Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И.* Механизмы выживания бактерий. М. : Медицина, 2005. 367 с.
32. *Бухарин О.В.* Персистенция патогенных бактерий. М. : Медицина ; Екатеринбург : УрО РАН, 1999. 366 с.
33. *Cerca N., Martins S., Sillankorva S. et al.* Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71, № 12. P. 8677–8682.
34. *Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D, Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A.* Early signaling events induced by elicitors of plant defenses // Mol. Plant-Microbe Interact. 2006. Vol. 19, № 7. P. 711–724.
35. *Zeilinger S., Galhaup C., Payer K.* Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host // Fungal. Genet. Biol. 1999. Vol. 26, № 2. P. 131–40.
36. *Singh P., Shin Y., Park C., Chung Y.* Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria // Phytopathology. 1999. № 89. P. 92–99.
37. *Mearns-Spragg A.* Cross-species induction and encasement of antimicrobial activity produced by epibiotic bacteria from marine algae and invertebrates, after exposure to terrestrial bacteria // Lett. Appl. Microbiol. 1998. № 27. P. 142–146.
38. *Головина И.Г.* Литические ферменты микроорганизмов // Успехи микробиологии. 1972. № 8. С. 108–134.
39. *Peterson S., Dunn A., Klimowicz A. Handelsman J.* Peptidoglycan from *Bacillus cereus* mediates commensalisms with rhizosphere bacteria from the *Cytopaga-Flavobacterium* group // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, № 8. P. 5421–5427.
40. *Xu X.-L., Lee R., Fang H.-M., Wang Y.-M. et al.* Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p // Cell Host&Microbe. 2008. Vol. 4, № 1. P. 28–39.

Поступила в редакцию 17.06.2011 г.

Alexander V. Semenov

Orenburg Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Division
of Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

CHARACTERISTIC OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *Staphylococcus aureus* IN CROSS-SPECIES INTERACTION BETWEEN MICROORGANISMS

The aim of this study is to investigate the antagonistic activity and production of antimicrobial factors *S. aureus* in the cross-species interaction.

The cross-species interaction in "strain of the antagonist *S. aureus* – a strain-associates" system was studied by using the original method (patent RU, №2376381) based on testing the biological properties of the investigated antagonist *S. aureus*, which was treated with metabolites and peptidoglycan cell wall of the associative microorganisms. Strain-antagonist *S. aureus* is isolated from the skin of the hands of the carrier. All other microorganisms are isolated from female reproductive tract, including strain-associates – *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *S. hominis*, *Corynebacterium minutissimum*, *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacae* and *Candida albicans*, test-culture – *L. acidophilus*, *L. casei* u *S. hominis*. The production of antimicrobial substances – lytic enzymes – was studied with the help of traditional biochemical methods.

On the example of antagonistic activity of *S. aureus* it was shown that the biological properties of bacteria may be changed in the cross-species interaction with associative microorganisms, which act: indifferently, in stimulating, inhibiting and inverted ways. The factors regulating properties antagonist are the metabolites and fragments of cell wall associates. The ability to regulate the cross-species interaction in the system "prokaryotes – prokaryotes" is new properties fragments of cell walls of bacteria and fungi. The change the antagonism is due to the regulation of production and / or activity of antimicrobial substances, such as lysozyme. The received data motivate the position that antagonistic activity stain – a result of the cross-species interaction between microorganisms, where a stain-antagonist executes the role producent antimicrobial factors, but associative stains define the possibility and the expression of their production.

Thus, associative microorganisms can play an active role in the formation and functioning of microbiocenoses, due to their ability to regulate the biological properties of bacteria. For example, when transient *S. aureus* enters a vaginal biotope, the presence of a *Candida* sp. will increase the antagonism of staphylococci against indigenous lactobacilli – the predominant microorganisms of the vaginal microbiota, thus contributing to the colonization of the biotope by staphylococci and the formation of a new microbial community. On the other hand, the decreasing of antagonism *S. aureus* against lactobacilli, for example, under the action of staphylococci and enterobacteria, would prevent the colonization of the biotope by *S. aureus*. A new mechanism of colonization resistance of the microbiocenoses – the reducing colonization properties of transient microorganisms is proposed. Microbial inhibitors of colonization factors of pathogens are prospective for the development of new anti-infective drugs.

Key words: microbial ecology; cross-species; antagonism; colonization; colonization resistance; cell wall.

Received June 17, 2011