



УДК 577:615.31

Хроматографический анализ жирных кислот клеточных стенок бифидобактерий с различной гидрофобностью

Захарова Ю.В., Сухих А.С.

ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Кемерово

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

Жирные кислоты клеточной мембраны *Bifidobacterium bifidum* проанализированы методом ГХ/МС. Экстракцию жирных кислот из бактериальных клеток с разной гидрофобностью осуществляли смесью хлороформ : гексан. Установлено, что гидрофобность определяется разным содержанием в мембране бактерий ненасыщенных и разветвленных жирных кислот. Только у высокогидрофобных бифидобактерий обнаружили изопентадекановую (*iso*C15:0) и метилтетрадекановую (13Me-C14:0) кислоты. При средней гидрофобности установлено высокое содержание изопальмитиновой (*iso*C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот. Низкогидрофобные штаммы характеризуются низким содержанием мононенасыщенных жирных кислот.

Ключевые слова: ГХ-МС, жирные кислоты, бифидобактерии, гидрофобность

Chromatographic analyses of membrane fatty acid *Bifidobacterium* with different hydrophobicity

Zakharova Yu.V., Sukhikh A.S.

Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo

Bifidobacteria are representatives of normal microflora of man, they control the qualitative and quantitative composition of the community, prevent the overgrowth of opportunistic bacteria. A detailed study are required molecular mechanisms of biofilm formation on the mucous membrane, and, in fact, the initial stages of interaction of the microflora with the intestinal wall. The features of the composition of fatty acids that form the cell wall of *Bifidobacterium bifidum*, not studied in full. The aim of the research is to study the qualitative and quantitative composition of fatty acids of the membranes of bifidobacteria with different hydrophobicity to establishing mechanisms of the adhesive activity of microorganisms.

The study used culture *Bifidobacterium bifidum*, isolated from the gut of healthy children. The hydrophobicity of bifidobacteria was studied by Rosenberg et al. with modifications L-Q Wang et al. The lipid fraction extracted from the washed isotonic NaCl broth culture of bifidobacteria by extraction with a mixture of chloroform : n-hexane (1:1). The resulting extract was subjected to methylation. For this purpose, a sample volume of 1 ml was placed in a vial with a volume of 1.5 ml, the solvent was evaporated under a stream of inert gas to dryness. To the dry residue was added 500 μ l of a 3% solution of H₂SO₄ in MeOH. The resulting solution was added internal standard (10 μ g undecenoic acid (Aldrich)). Then the sample was heated at 900 ° C within one hour. Further extraction was carried out with 700 μ l of hexane. The volume selected hexane fraction was concentrated by Stripping of solvent to volume of 200 μ l. The obtained sample containing fatty acids as methyl esters were used for the analysis. Methylated samples were analyzed on gas chromatography / mass spectrometer Agilent 7000B using the column: ZB-WAX, 30m*0.25 mm*0.25 μ m. The sample volume was 2 μ l enter without division of the flow, the flow rate of 1ml/min. For statistical analysis used the software package Statistica version 6.1.

When analyzing the amount of saturated fatty acids in strains with different hydrophobicity were observed statistically significant differences in the concentrations of the isoforms, methylated and long-chain

fatty acids, i.e., those forms that define the liquid-crystalline state of the membrane ($p=0.00$). It is established that *isopentadecanoic acid* (isoC15:0) was present only in high hydrophobic bifidobacteria. Also they have a large number of registered 13-methyl-tetradecanoic acid (me-C14:0), its content was 1.3 μg . In cultures with medium hydrophobicity such acid is not detected, low hydrophobic noted a small the content is 0.1 μg . With the medium hydrophobic of bifidobacteria were also absent 12-methyl-tetradecanoate (Me-C14:0) and palmitic (C16:0) acids, whereas at high and discovering strains their content varied in the range of 0.3-0.4 and 11.4 μg -12,5 μg , respectively. It was found that bifidobacteria with low hydrophobic content of all unsaturated fatty acids was reduced in comparison with low hydrophobic cultures. Data of GC-MS of the analysis of fatty acids of a membrane of *B. bifidum* allow to predict ability of a strain to adhesion that it is necessary to consider at correction of microecological violations.

Thus, the mechanisms of changes in hydrophobicity, which plays a major role in nonspecific adhesion of bacteria, determined by the regulation of the content of unsaturated and branched fatty acids in the composition of cell walls of microorganisms.

Keywords: GC-MS, fatty acid, bifidobacterium, hydrophobicity

Введение

Бифидобактерии являются доминирующими микроорганизмами среди кишечной микрофлоры. Они контролируют качественный и количественный состав сообщества, предотвращают избыточный рост условно-патогенных бактерий. Достигается это с помощью многочисленных механизмов, которые активно изучаются [1, 2]. Особое внимание уделяют начальным этапам взаимодействия микрофлоры со стенкой кишечника, так как нарушение формирования биопленки на слизистой, лежит в основе развития микробиологических нарушений и здоровья человека в целом [1, 3].

Взаимодействие между микрофлорой и слизистой кишечника начинается с неспецифической адгезии. Неспецифическая адгезия (*docking*) обратима и обусловлена физико-химическими особенностями молекул, в том числе и гидрофобностью [4, 5]. В настоящее время гидрофобность изучается как свойство, позволяющее бактериям не только взаимодействовать с углеродсодержащими материалами, но и друг с другом, со слизистой кишечника, с иммунокомпетентными клетками. В большинстве случаев гидрофобность клетке придают жирные кислоты липидов цитоплазматической мембраны бактерий. В настоящее время насчитывают более двухсот пятидесяти бактериальных жирных кислот, тогда как у человека их в 10 раз меньше. С помощью газовой хроматографии изучен состав жирных кислот большинства микроорганизмов, определены маркеры отдельных родов и видов бактерий, т.е. исследование жирнокислотного состава бактериальных липидов осуществляют с целью идентификации и таксономии микроорганизмов, а также для диагностики инфекций и дисбиотических нарушений непосредственно по клиническому материалу [6, 7]. При этом слабо изучены вопросы влияния структуры и состава жирных кислот на биологические свойства микроорганизмов, от которых зависит стабильность микросимбиоза, а также длительность и глубина микробиологических нарушений.

Цель исследования – изучение качественного и количественного состава жирных кислот мембран бифидобактерий с разной гидрофобностью для установления механизмов нарушений адгезивной активности микроорганизмов.

Теоретическая часть

Примерно 90% жирных кислот используется микроорганизмами для синтеза фосфолипидов плазматической мембраны, 10% участвуют в образовании липоевой

кислоты, биотина, у грамотрицательных бактерий – для синтеза липополисахаридов. Центральную роль в синтезе жирных кислот выполняет ацилпереносящий белок (АПБ) – термостабильный белковый кофактор. Он переносит растущую ацильную цепь от одного фермента к другому и доставляет молекулы-предшественники для реакции конденсации. Ферменты синтеза жирных кислот локализованы у бактерий между цитоплазмой и внутренней стороной плазматической мембраны. Их активность определяется внешними факторами, что и обуславливает различие в путях синтеза жирных кислот [5]. В связи с этим меняется относительное содержание различных жирных кислот, длина их цепей, насыщенность. Установлено, что у анаэробных бактерий предшественником ненасыщенных жирных кислот (С 16:1, С18:1) служит С₁₀-АПБ, а стимулирует их образование понижение температуры и содержания кислорода (анаэробный путь синтеза). Кроме этого существует аэробный путь синтеза ненасыщенных жирных кислот из насыщенных. Он характерен для аэробных грамположительных бактерий. У некоторых грамположительных бактерий помимо неразветвленных насыщенных жирных кислот присутствуют изо-, антеизо- и ω -алициклические жирные кислоты, которые придают текучесть мембране. Их синтез отличается от синтеза жирных кислот с неразветвленной цепью только использованием различных ацил-АПБ в качестве затравки для удлинения цепи и специфичностью ферментов, катализирующих конденсацию молекул. Предшественниками таких модифицированных затравок служат разветвленные 2-оксикислоты, экзогенные разветвленные короткоцепочечные карбоновые кислоты [7].

Таким образом, любые изменения в микросимбиозе будут обуславливать различия в путях синтеза жирных кислот у бактерий. В связи с этим актуальным является исследование жирнокислотного состава мембраны при различной гидрофобности бактерий, что позволит раскрыть некоторые механизмы развития микробиологических нарушений.

Эксперимент

Объектом исследования были культуры *Bifidobacterium bifidum*, выделенные из кишечника здоровых детей. Выделение бифидобактерий проводили рутинным бактериологическим методом. Для создания анаэробных условий применяли анаэроостаты (BBL, США) и газогенерирующие пакеты (НПО «Новое дело», Санкт-Петербург). Идентификацию бактерий осуществляли на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств. Последние изучали с использованием коммерческих тест систем ANAERO-TEST 23 (Lachema, Чехия). Гидрофобность бифидобактерий оценивали по Rosenberg et al. с модификациями L-Q Wang et al. [5]. Для этого бифидобактерии выращивали 24 часа на жидкой среде Блаурокк, а затем центрифугировали при 8 000 g в течение 10 мин. Бактериальную массу дважды отмывали фосфатным буфером и ресуспендировали в том же растворе. Определяли оптическую плотность (A) раствора при длине волны 600 нм. Затем к 3 мл бактериальной суспензии добавляли 1 мл додекана. Фазы перемешивали на Vortex в течение 2 минут и оставляли на 1 час при температуре 37°C для их разделения. Определяли оптическую плотность (A) водной фазы при 600 nm. Аффинитет к углеводородам рассчитывали как процент гидрофобности (Н%) по формуле $H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$, где A₀ и A – оптическая плотность до и после обработки бактериальной суспензии додеканом. Штаммы считали

высокогидрофобными при $H=60\%$ и $>$, среднегидрофобными при $H=40-59\%$, низкогидрофобными при $H\leq 39\%$.

Жирнокислотный состав бактериальных липидов определяли с помощью газожидкостной хроматографии. 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 виалу объемом 1.5 мл, растворитель отдували азотом досуха. К сухому остатку добавляли 500 мкл 3% раствора H_2SO_4 в MeOH. К полученному раствору добавляли внутренний стандарт (10 мкг ундеценовой кислоты). Затем образец нагревали при $90^\circ C$ в течение часа. Далее проводили экстракцию 700 мкл гексана. Объем отобранной гексановой фракции концентрировали отдувкой растворителя до объема 200 мкл. Полученную пробу, 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, $30m*0.25mm*0.25\mu m$, Условия хроматографирования: Oven Program $50^\circ C$ for 0 min then $8^\circ C/min$ to $260^\circ C-5min$, Flow-1мл/мин.

Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ Statistica (версия 6.1 лицензионное соглашение ВХХР 006ВО92218 FAN 11).

Обсуждение результатов

Установлено, что масса жирных кислот на 0,01 г сухого остатка у штаммов с высокой и средней гидрофобностью статистически не отличалась друг от друга и составляла 30.4 и 33.6 мкг соответственно ($p=0.2$). У бифидобактерий с низкой гидрофобностью масса жирных кислот была снижена до 14,5 мг ($p=0.03$).

Не зависимо от гидрофобности в составе клеточной стенки бифидобактерий преобладали насыщенные жирные кислоты. У высоко и низкогидрофобных штаммов на долю насыщенных жирных кислот приходилось 64.2% и 71.3% соответственно, тогда как при средней гидрофобности доля этих кислот была наибольшей и составляла 91.1%.

Среди насыщенных жирных кислот у бифидобактерий были обнаружены следующие: лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), пальмитиновая (C16:0), гептадекановая (C17:0), стеариновая (C18:0), арахиновая (эйкозановая) (C20:0) кислоты. Также среди них присутствовали метилированные кислоты или кислоты с разветвленной цепочкой - 12-метил-тетрадекановая (12Me-C14:0), 13-метил-тетрадекановая (13Me-C14:0), изопентадекановая (*iso*C15:0), изопальмитиновая (*iso*C16:0). Разветвленные или алициклические жирные кислоты, благодаря особенностям химического строения у грамположительных бактерий выполняют адаптивную функцию, придавая текучесть и пластичность мембране [6]. Такая же функция присуща и ненасыщенным жирным кислотам, наибольшая доля которых обнаружена у бифидобактерий с высокогидрофобными свойствами (35.8%), несколько меньше у штаммов с низкой гидрофобностью (28.7%). Самое низкое содержание ненасыщенных жирных кислот регистрировали при средней гидрофобности, их доля в общей структуре жирных кислот не превышала 8.9%.

Среди мононенасыщенных жирных кислот у бифидобактерий присутствовали миристоолеиновая (C14:1), пентадеценовая (C15:1), пальмитолеиновая (C16:1), *n*-гептадеценовая (C17:1), олеиновая (C18:1). Также были обнаружены

полиненасыщенные жирные кислоты – гексадекадиеновая (C16:2) и линолевоваевая (C18:2).

Количественный состав некоторых жирных кислот бифидофлоры с разной гидрофобностью не отличался друг от друга. Так содержание миристиновой кислоты (C14:0) у высоко и низкогидрофобных штаммов составляло 2.7 и 2.9 мкг соответственно, тогда как при средней гидрофобности не превышало 1.6 мкг, однако, разница была статистически не значима ($p=0.1$). Также у штаммов с разной гидрофобностью не было статистически значимых отличий по содержанию пентадекановой (C15:0) и гептадекановой кислот (C17:0), количество которых составило у высокогидрофобных культур по 0,7 мкг, у среднегидрофобных по 0.9 и 0.5 мкг и низкогидрофобных 1.1 и 0.4 мкг соответственно ($p=0,07$).

При анализе количества насыщенных жирных кислот у штаммов с разной гидрофобностью отмечали статистически значимые различия по содержанию изоформ, метилированных и длинноцепочечных жирных кислот, т.е. тех форм, которые определяют жидкокристаллическое состояние мембраны ($p=0,00$). Установлено, что изопентадекановая кислота (isoC15:0) присутствовала только у высокогидрофобных бифидобактерий. Также у них в большом количестве регистрировали 13-метил-тетрадекановую кислоту (13Me-C14:0), ее содержание составило 1.3 мкг (рис. 1). У культур со средней гидрофобностью такую кислоту не детектировали, а при низкой гидрофобности отмечали небольшое ее содержание – 0.1 мкг. У среднегидрофобных бифидобактерий также отсутствовали 12-метил-тетрадекановая (12Me-C14:0) и пальмитиновая (C16:0) кислоты, тогда как у высоко и низкогидрофобных штаммов их содержание колебалось в диапазоне 0.3-0.4 мкг и 11,4 –12,5 мкг соответственно. Жидкокристаллическое состояние мембраны у среднегидрофобных бифидобактерий было связано с высоким содержанием изопальмитиновой (isoC16:0) (20.4 мкг) и стеариновой (C18:0) (23.6 мкг) кислот.

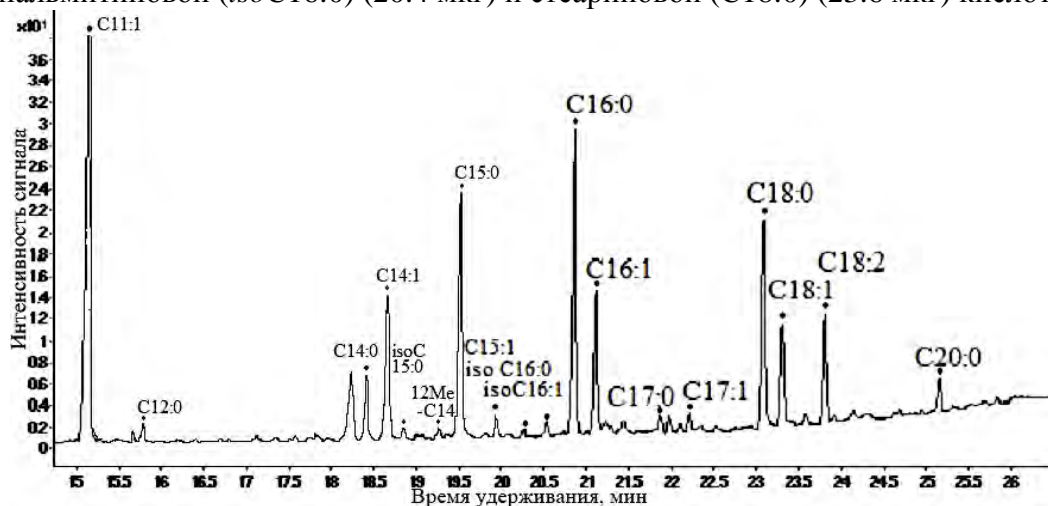


Рис. 1. Интегрированная хроматограмма жирных кислот мембраны высокогидрофобного штамма бифидобактерий

При высокой и низкой гидрофобности количество изопальмитиновой (isoC16:0) кислоты не превышало 0.3 и 0.4 мкг соответственно, масса стеариновой кислоты (C18:0) составляла 8.0 и 7.2 мкг соответственно.

В составе мембраны среднегидрофобных бифидобактерий отсутствовали такие мононенасыщенные жирные кислоты как миристоолеиновая (C14:1), пентадеценная (C15:1), пальмитолеиновая (C16:1), н-гептадеценная (C17:1). Была обнаружена только олеиновая (C18:1) кислота в количестве 1.4 мкг (рис. 2).

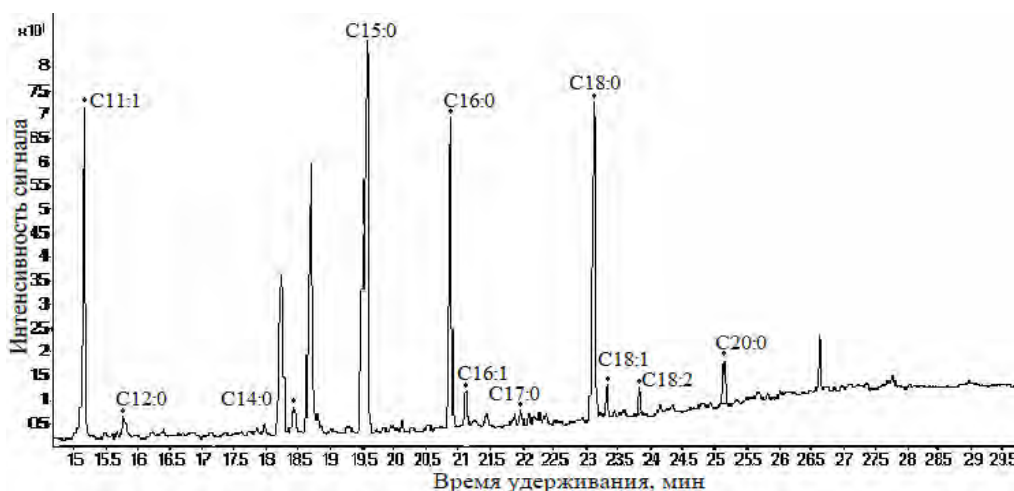


Рис. 2. Интегрированная хроматограмма жирных кислот мембраны среднегидрофобного штамма бифидобактерий

При высокой гидрофобности мембраны регистрировали все вышеуказанные ненасыщенные жирные кислоты (рис. 1). Самое большое количество приходилось на пальмитолеиновую (C16:1) кислоту, ее масса составила 4.6 мкг. Данная кислота в наибольшем количестве из ненасыщенных присутствует в составе мембран бактерий многих таксономических групп, т.е. полученные данные согласуются с данными литературы [6]. Также довольно часто у микроорганизмов обнаруживают олеиновую (C18:1) кислоту, содержание которой у высокогидрофобных бифидобактерий составило 3.8 мкг. Несколько меньше в составе мембраны содержалось миристоолеиновой (C14:1) (2.7 мкг) и гептадеценовой (C17:1) (0.5 мкг) кислот. Пентадеценовая кислота (C15:1) у высокогидрофобных штаммов регистрировалась в количестве не более 0,1 мкг.

Установлено, что у бифидобактерий с низкой гидрофобностью содержание всех жирных кислот было снижено по сравнению с высокогидрофобными культурами (рис.3).

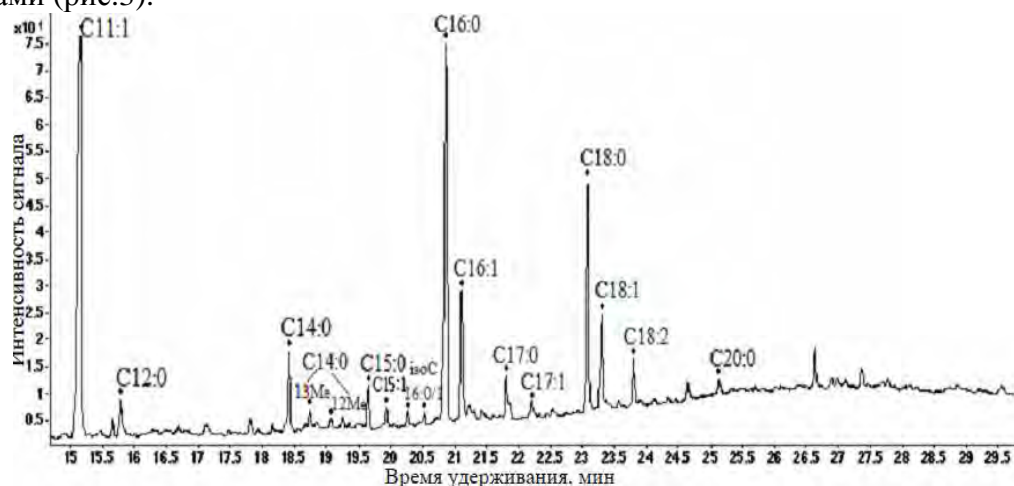


Рис. 3. Интегрированная хроматограмма жирных кислот мембраны низкогидрофобного штамма бифидобактерий

При этом из мононенасыщенных кислот также в наибольшем количестве содержалась пальмитолеиновая (C16:1) (3,7 мкг) и олеиновая (C18:1) (3.2 мкг) кислоты. Миристоолеиновая (C14:1) кислота содержалась в количестве 0.6 мкг.

Наименьшей была масса пентадеценовой (C15:1) и гептадеценовой (C17:1) кислот, она составила по 0.4 мкг.

Полиненасыщенная линолевая (C18:2) кислота присутствовала в составе липидов всех изученных штаммов бифидобактерий. Максимальное ее количество регистрировалось при высокой гидрофобности и составляло 3.6 мкг, в 2 раза меньше ее содержалось у среднегидрофобных культур бифидобактерий (1,8 мкг), меньше всего данной кислоты было обнаружено у низкогидрофобных штаммов (1,3 мкг).

Заключение

Большое разнообразие и в тоже время специфичность жирных кислот микроорганизмов обуславливают возможность родовой и даже видовой идентификации бактерий [6]. Однако, являясь основным компонентом фосфолипидов, жирные кислоты определяют также физико-химические свойства микроорганизмов, такие как текучесть, устойчивость к температурам, гидрофобность. Установлено, что в целом масса жирных кислот при высокой и средней гидрофобности не отличалась друг от друга, тогда как у низкогидрофобных штаммов была снижена в 2 раза ($p=0.03$). Как и у большинства микроорганизмов у бифидобактерий содержались как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты с длиной цепи от 14 до 20 атомов углерода. Присутствие ненасыщенных и разветвленных жирных кислот увеличивает текучесть мембраны микроорганизмов [5, 6]. При этом синтез ненасыщенных и метилразветвленных жирных кислот регулируется внешними для микроорганизмов факторами, например, температурой, органическими липофильными соединениями микробного происхождения, наличием разветвленных короткоцепочечных карбоновых кислот, т.е., в целом, состоянием кишечного микросимбиоза [5].

У высокогидрофобных бифидобактерий отмечали высокое содержание и разнообразие ненасыщенных жирных кислот с одной или двумя двойными связями. Также при высокой гидрофобности у бифидобактерий обнаружены разветвленные жирные кислоты - изопентадекановая кислота (*iso*C15:0) и 13-метил-тетрадекановая кислота (13Me-C14:0). У штаммов со средней гидрофобностью из ненасыщенных присутствовала только олеиновая (C18:1) и линолевая (C18:2) кислоты в небольших количествах. Гидрофобность среднего уровня у штаммов была связана с изопальмитиновой (*iso*C16:0) кислотой, содержание которой было в 20 раз больше, чем у штаммов с высокой гидрофобностью. При низкой гидрофобности жидкокристаллическое состояние мембраны определяли ненасыщенные жирные кислоты, содержание которых было снижено, по сравнению с высокогидрофобными культурами. При этом отмечали сходство состава ненасыщенных жирных кислот при низкой и высокой гидрофобности. Однако у штаммов с низкой гидрофобностью в клеточной стенке отсутствовали метилразветвленные жирные кислоты.

Таким образом, механизмы изменения гидрофобности, которая играет основную роль в неспецифической адгезии бактерий, определяются регуляцией содержания ненасыщенных и разветвленных жирных кислот в составе клеточной стенки микроорганизмов.

Список литературы

1. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Хлопко Ю.А. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009. № 4. С. 4-8.
2. Захарова Ю.В. // *Медицина в Кузбассе*. 2010. № 1. С. 14-16.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2012. № 4. С. 51-56.
4. Ukuku D.,Yuk H-G., Zhang H. // *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011. Vol. 8 (10). pp. 1103-1109.
5. Wang L-Q., Meng X-Ch., Zhang B-R. // *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 26. pp. 1999-2007.
6. Будников Г.К. Химический анализ в медицинской диагностике. М.: Наука, 2010, 504 с.
7. Schneiter R., Toulmay A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. Vol. 73. pp. 1224-1232.

References

- 1.Buharin O.V., Usvjacov B.Ja., Hlopko Ju.A., *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*, 2009, No 4, pp. 4-8.
- 2.Zaharova Ju.V., *Medicina v Kuzbasse*, 2010, No 1, pp. 14-16.
- 3.Buharin O.V., Perunova N.B., Ivanova E.V., *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*, 2012, No 4, pp. 51-56.
- 4.Ukuku D.,Yuk H-G., Zhang H., *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, Vol. 8 (10), pp. 1103-1109.
- 5.Wang L-Q., Meng X-Ch., Zhang B-R., *Word J. of Microbiology and Biotechnology*, 2010, Vol. 26, pp. 1999-2007.
- 6.Budnikov G.K. Himicheskij analiz v medicinskoj diagnostike. M.: Nauka, 2010, 504 p.
- 7.Schneiter R., Toulmay A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, Vol. 73, pp. 1224-1232.

Захарова Юлия Викторовна – доцент кафедры микробиологии иммунологии и вирусологии, к.м.н., ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Кемерово

Сухих Андрей Сергеевич – ст. науч. сотр. ЦНИЛ к.фарм.н., доцент, ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Кемерово. 8(3842) 52-10-18

Zakharova Yulia V. – Ph.D. (medical) associate senior lecturer chair of microbiology immunology and virology Kemerovo State medical academy, Kemerovo

Sukhikh Andrey S. – Ph.D. (pharm.), senior scientific worker of CSRL Kemerovo State medical academy, Kemerovo. e-mail: Suhih_as@list.ru