

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-86>

## Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека

Бухарин О.В., Андрищенко С.В.✉, Перунова Н.Б., Иванова Е.В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

### Аннотация

**Цель исследования** — определить роль ацетата в персистенции индигенных бифидобактерий в кишечном биотопе через лизоцимрезистентность в модельных условиях ацетилирования–деацетилирования пептидогликана.

**Материалы и методы.** Исследовано по 16 штаммов двух видов индигенных бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Бифидобактерии культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при содержании O<sub>2</sub> 0,6%, CO<sub>2</sub> 9% и температуре 37°C в течение 48 ч. Продукцию уксусной кислоты (ацетата) бифидобактериями выявляли методом газовой хроматографии. Влияние ацетата на устойчивость неиндигенных грамположительных бактерий к лизоциму определяли на модели штамма *Listeria monocytogenes* ICIS-280 путём культивирования в бульоне LB-Lennox с добавлением ацетата аммония в диапазоне концентраций, продуцируемых исследуемыми бифидобактериями, в серии разведений лизоцима в конечных концентрациях от 5 до 40 мкг/мл в течение 24 ч.

**Результаты.** Установлено, что у *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* выделение ацетата в среднем было в 2 раза выше, чем у *Bifidobacterium bifidum* (14,7 и 27 ммоль/л соответственно), и вполне соответствовало концентрациям уксусной кислоты, определённым в кишечном содержимом (до 50 ммоль/л). Культивирование бифидобактерий в среде с лизоцимом, ацетатом аммония и их сочетанием не оказало существенного влияния на их показатели роста при максимальных использованных концентрациях данных веществ. У тест-штамма добавление ацетата аммония в диапазоне, создаваемом бифидобактериями, вызывало снижение минимальной подавляющей концентрации лизоцима более чем в 2 раза — от 40 до менее 20 мкг/мл. В контрольной среде без лизоцима не отмечено ингибирования роста индикаторной культуры вплоть до максимальных концентраций ацетата аммония.

**Заключение.** Выявлен механизм персистенции (выживания) индигенных бифидобактерий в кишечном биотопе человека путём продукции ацетата, избирательно подавляющего лизоцимрезистентность неиндигенных грамположительных бактерий, за счёт обратимости деацетилирования пептидогликана, что позволяет индигенным бифидобактериям сохранять стабильное доминантное положение в биотопе.

**Ключевые слова:** бифидобактерии, персистенция, пептидогликан, лизоцимрезистентность, ацетат, кишечная микробиота, микробиоценоз

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биоэтике ИКВС УрО РАН (протокол № 1 от 21.04.2020).

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Бухарин О.В., Андрищенко С.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):276–282.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-86>

# Mechanism of persistence of indigenous bifidobacteria under the impact of acetate in the human colon biotope

Oleg V. Bukharin, Sergey V. Andryuschenko<sup>✉</sup>, Natalia B. Perunova, Elena V. Ivanova

Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Orenburg of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia

## Abstract

**Aim.** To determine the role of the acetate in the persistence of indigenous bifidobacteria in the colon biotope through the lysozyme resistance in model conditions of the acetylation–deacetylation of peptidoglycan.

**Materials and methods.** The study was performed on 16 strains of the two indigenous bifidobacteria species: *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Bifidobacteria was cultivated in the 0.6% O<sub>2</sub> and 9% CO<sub>2</sub> atmosphere at the temperature 37°C in CO<sub>2</sub> incubator for 48 hours. The production of the acetate by the bifidobacteria was determined by gas chromatography. The effect of the acetate on the lysozyme resistance of non-indigenous gram-positive bacteria was determined on the *Listeria monocytogenes* ICIS-280 model strain by the cultivation in LB-Lennox broth with ammonium acetate added in the concentration range matching the concentrations produced by the studied bifidobacteria, in lysozyme serial dilutions at final concentrations 5 µg/ml to 40 µg/ml within 24 hours.

**Results.** It was found that the acetate release of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* was on average two times higher that of *Bifidobacterium bifidum* (27.0 and 14.7 mmol/liter, respectively) and was quite consistent with the concentrations of acetic acid determined in the intestinal contents (up to 50 mmol/liter). Cultivation of bifidobacteria in a medium with lysozyme, ammonium acetate and their combination did not have a significant impact on their growth parameters at the maximum used concentrations of these substances. In the test strain, the addition of ammonium acetate in the range created by bifidobacteria caused a decrease in the minimum inhibitory concentration of lysozyme by more than two times — from 40 µg/ml to less than 20 µg/ml. In the control medium without lysozyme, no inhibition of the growth of the indicator culture was observed up to the maximum concentrations of ammonium acetate.

**Conclusion.** The mechanism of persistence (survival) of indigenous bifidobacteria in the human intestinal biotope has been identified, which is associated with the production of acetic acid at a level that selectively suppresses lysozyme resistance of non-indigenous gram-positive microbiota via reversible deacetylation of peptidoglycan. This allows indigenous bifidobacteria to maintain a stable dominant position in the biotope.

**Keywords:** *bifidobacteria*, *bacterial persistence*, *peptidoglycan*, *lysozyme resistance*, *acetate*, *intestinal microbiota*, *microbiocenosis*

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Bioethics Committee of the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis (Approval No. 1, 21.04.2020).

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Bukharin O.V., Andryuschenko S.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Mechanism of persistence of indigenous bifidobacteria under the impact of acetate in the human colon biotope. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):276–282.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-86>

## Введение

Среди биотопов организма человека толстый кишечник отличается исключительно высокой численностью и разнообразием микроорганизмов. Данные об их экологической структуре, механизмах и условиях формирования всё ещё характеризуются существенной неполнотой и противоречивостью. В данном биотопе обращают на себя внимание бактерии рода *Bifidobacterium*, которые важны для нормального функционирования пищеварительного тракта человека [1] и дискриминации в организме патогенов [2].

Главным конечным метаболитом индигенных бифидобактерий является уксусная кислота [3]. Ранее было показано, что именно её продукция предотвращает летальную инфекцию энтеропатогенных *Escherichia coli* [4]. Однако механизм протективного эффекта метаболитов бифидобактерий в отношении патогенной или условно-патогенной грамположительной микробиоты не изучен.

Известно, что в основе формирования симбиотических взаимодействий бактерий с хозяином лежит явление персистенции (длительного выживания микроорганизмов в организме хозяина), где ключе-

вой биомембране иммунитета является клеточная стенка — её пептидогликан (ПГ) [5], а разрушает ПГ фермент лизоцим. В случае грамположительных бактерий ПГ открыт для иммунной системы хозяина (не защищен). Единственный описанный к настоящему времени механизм обеспечения устойчивости грамположительных бактерий к ферментативному действию лизоцима — модификация ПГ [6].

Известны два наиболее распространённых пути такой модификации:

1) О-ацетилирование ПГ, встречающееся как у грамположительных, так и у некоторых грамотрицательных бактерий [7], обеспечивающее толерантность к лизоциму ПГ *Bifidobacterium longum* [8];

2) де-N-ацетилирование ПГ, выявляемое только у грамположительных бактерий.

Наше внимание обратил на себя тот факт, что де-N-ацетилазы ПГ выявлялись преимущественно у микроорганизмов, которые нельзя было отнести к резидентной микробиоте человека, в частности бацилл, клостридий [9] и листерий. Однако именно этот механизм обеспечивал основной вклад в их лизоцимрезистентность [10].

Оба механизма включали уксусную кислоту, но в разнонаправленном качестве. В случае О-ацетилирования её остаток (ацетат) присоединяется к остатку N-ацетилмурамовой кислоты ПГ, а в случае де-N-ацетилирования — отщепляется от остатка N-ацетилглюкозамина ПГ. При этом фермент де-N-ацетилаза ПГ, относящийся к 4-му семейству эстераз углеводов, подобно деацетилазе хитина, также является обратимым [11]. Поэтому избыточный ацетат в среде способен смещать равновесие реакции деацетилирования в сторону интактного ПГ. Другими словами, свободный ацетат может блокировать устойчивость к лизоциму чужеродных для кишечника человека грамположительных бактерий.

**Цель** исследования — определить роль ацетата в персистенции индигенных бифидобактерий в кишечном биоценозе через лизоцимрезистентность в модельных условиях ацетилирования–деацетилирования ПГ.

## Материалы и методы

### Объекты исследования

На первом этапе работы были отобраны 16 штаммов двух наиболее распространённых видов индигенных бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, выделенных ранее после получения информированного согласия от условно здоровых лиц (по 1 штамму от каждого обследуемого) в лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН в рамках исследования «Диагностический цитокиновый маркер бесплодия мужчин — интерлейкин 4» (протокол заседания локального комитета по биоэтике ИКВС УрО РАН от 21.04.2021 № 1). Штаммы

идентифицировали по культурально-морфологическим признакам, биохимическим свойствам с использованием набора «ANAEROtest-23» («LaChema») и по белковому профилю методом MALDI-TOF на масс-спектрометре «Microflex» («Bruker Daltonics»).

### Определение ацетат-продукции бифидобактериями

С целью установления диапазона концентраций ацетата, создаваемого индигенными бифидобактериями кишечника, определяли уровень его продукции *in vitro* методом газовой хроматографии. Бифидобактерии вносили в количестве  $10^8$  КОЕ в объёме 0,1 мл бактериальной взвеси в 0,9% растворе NaCl в 4,9 мл бульона Shaedler («HiMedia») и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Binder») при содержании O<sub>2</sub> 0,6%, CO<sub>2</sub> 9% и температуре 37°C в течение 48 ч. Пробы центрифугировали при 13 600g в течение 15 мин, к 500 мкл супернатанта добавляли 50 мкл 98% серной кислоты («Panreac»). Экстракцию летучих жирных кислот из образцов осуществляли в 750 мкл изобутилового спирта («Sigma-Aldrich»), процесс повторяли дважды. Детекцию ацетата проводили в газожидкостном хроматографе «GC-2010 Plus» («Shimadzu»), оборудованном пламенно-ионизационным детектором с капиллярной колонкой HP-FFAP («Agilent Technologies») диаметром 0,32 мм, длиной 50 м. Температура испарителя составила 240°C; температурная программа для капиллярной колонки: 0 мин — 70°C, 10 мин — 160°C, 5 мин — 180°C и 25 мин — 240°C; температура детектора — 260°C. В качестве газа-носителя использован гелий, скорость газа-носителя — 21 см/с. Расчёт концентраций по площадям пиков осуществляли с помощью программного обеспечения «GCsolution» («Shimadzu»).

### Определение влияния ацетата на уровень лизоцимрезистентности бактерий

Устойчивость бактерий к лизоциму определяли путём культивирования в бульоне LB-Lennox с добавлением серии разведений лизоцима куриного яичного белка («Sigma») в конечных концентрациях 5–40 мкг/мл в 3 повторах.

Среди грамположительных неиндигенных бактерий в качестве индикатора нами была выбрана тест-культура *Listeria monocytogenes* (штамм ICIS-280), поскольку для данного вида наиболее полно описана роль де-N-ацетилазы ПГ в обеспечении устойчивости к С-лизоциму [10]. Модельные условия инкубации тест-штамма: в бульоне LB-Lennox при 37°C в течение 24 ч в серии разведений лизоцима, идентичных указанным для бифидобактерий.

Для определения влияния ацетата на устойчивость исследуемых бактерий к лизоциму использовали нейтральную соль уксусной кислоты — ацетата аммония, добавленную в среду культивирова-

Характеристика продукции ацетата исследуемыми штаммами бифидобактерий ( $M \pm m$ )

Characteristics of the acetate production of the studied bifidobacteria strains ( $M \pm m$ )

<i>B. bifidum</i>		<i>B. longum</i>	
штаммы strains	ацетат, мМ acetate, mM	штаммы strains	ацетат, мМ acetate, mM
ICIS-216	6,4 ± 1,4	ICIS-281	11,2 ± 1,7
ICIS-503	7 ± 2,3	ICIS-744	12 ± 1,8
ICIS-629	7,3 ± 1,7	ICIS-1112	14,3 ± 1,8
ICIS-040	7,4 ± 1,8	ICIS-347	18 ± 1,6
ICIS-745	8,4 ± 1,2	ICIS-953	20 ± 1,55
ICIS-600	9,2 ± 2,3	ICIS-609	20,5 ± 2
ICIS-059	9,4 ± 1,6	ICIS-1113	22 ± 2,25
ICIS-752	10 ± 2,8	ICIS-749	23 ± 2,2
ICIS-460	11 ± 2,3	<b>ICIS-505</b>	<b>28,3 ± 2,8</b>
ICIS-105	13 ± 2,6	ICIS-950	28,6 ± 4,3
ICIS-949	13 ± 2,4	ICIS-984	29,1 ± 2,7
ICIS-349	15 ± 2,5	ICIS-1122	35 ± 3,5
ICIS-1074	21 ± 3,5	ICIS-889	38 ± 2,9
ICIS-750	22,4 ± 1,7	ICIS-049	39,1 ± 3,4
ICIS-691	36,4 ± 2,7	ICIS-210	42,5 ± 3
<b>ICIS-310</b>	<b>38,5 ± 1,7</b>	ICIS-627	50,6 ± 3,1
Среднее Average	14,7 ± 2,5	Среднее Average	27 ± 2,9

**Примечание.** Выделены штаммы, подвергнутые полногеномному секвенированию.

**Note.** The strains with available complete genome sequences are emphasized.

ния в диапазоне молярных концентраций ацетата, создаваемых исследованными штаммами бифидобактерий. Наличие роста тест-штамма определяли фотометрически на микропланшетном фотометре «Multiscan Ascent» при длине волны 450 нм и превышении оптической плотности (ОП) культуральной среды над таковой у контрольного стерильного бульона более чем на 0,01. Статистический анализ проводили с использованием критерия *U* Манна-Уитни [12] в программе «Minitab 14.1».

## Результаты

### Характеристика ацетат-продукции индигенных бифидобактерий

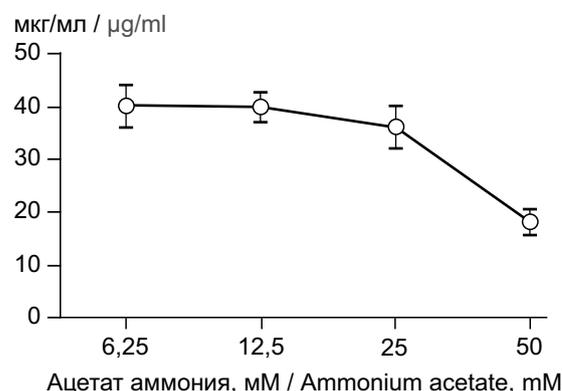
У бактерий вида *B. bifidum* выделение уксусной кислоты варьировало в диапазоне 6,4–38,5 ммоль/л, тогда как у штаммов, принадлежащих к *B. longum* subsp. *longum*, выделение ацетата в среднем было в 2 раза выше ( $p < 0,01$ ), варьировало в пределах 11,2–50,6 ммоль/л (таблица) и вполне соответствовало концентрациям уксусной кислоты, определённым в кишечном содержимом [13].

В то же время максимальные уровни продукции ацетата у *B. bifidum* оказались на 10 ммоль/л вы-

ше среднего уровня, определённого для *B. longum* subsp. *longum*, но гомологов любого из 7 генов 2 систем активного транспорта фруктозы, маннозы и рибозы, описанных как ключевые детерминанты высокого уровня продукции ацетата бифидобактериями [4], не было выявлено ни в секвенированном ранее геноме штамма с рекордным уровнем ацетат-продукции (*B. bifidum* ICIS-310; NCBI BioProject accession: PRJNA345151), ни в одном из других секвенированных штаммов *B. bifidum*, депонированных в базах данных NCBI [14]. При этом в геноме штамма со средним уровнем продукции ацетата 28,3 ммоль/л (*B. longum* subsp. *longum* ICIS-505; NCBI BioProject accession: PRJNA379379) все данные детерминанты присутствовали в том же виде, что и в геномах типовых штаммов *B. longum* MC-42 и *B. longum* NCC2705. Данные факты показывают, что высокая интенсивность продукции уксусной кислоты бифидобактериями может быть обеспечена не только при наличии указанных в работе [4] генетических детерминант мембранного транспорта углеводов.

### Влияние ацетата на лизоцимрезистентность индикаторного штамма

Для оценки влияния ацетата на лизоцимрезистентность бактерий, деацетилирующих свой ПГ, проведено определение минимальной подавляющей концентрации лизоцима у тест-штамма *Listeria monocytogenes* в средах с добавлением ацетата аммония и лизоцима в 3 повторах. В качестве критерия роста культуры использовали повышение ОП контрольного штамма. В средах с комбинированным добавлением лизоцима и ацетата аммония в диапазоне, создаваемом индигенными бифидобактериями, отмечено снижение МПК лизоцима для штамма-индикатора более чем в 2 раза — от 40 до менее чем 20 мкг/мл (рис. 1). Устойчивость листе-



**Рис. 1.** Влияние ацетата аммония на минимальную подавляющую концентрацию лизоцима индикаторного штамма *Listeria monocytogenes* ICIS-280.

**Fig. 1.** Effect of the ammonium acetate on lysozyme minimum inhibitory concentration of the model strain *Listeria monocytogenes* ICIS-280.

рий к лизоциму в контрольной среде без добавления ацетата аммония не превышала 50 мкг/мл (положительный контроль). В контрольной среде без лизоцима (отрицательный контроль) не отмечено ингибирования роста индикаторной культуры вплоть до максимальных концентраций добавляемого ацетата аммония (50 ммоль/л).

Таким образом, полученный результат согласуется с описанным эффектом обратимости реакции деацетилирования углеводов [11]. Избыток ацетата в среде смещает реакцию деацетилирования ПГ бактерий в сторону исходного (нативного) состояния, чувствительного к лизоциму. Обнаружено, что ацетат, продуцируемый бифидобактериями, индигенными для биотопа, в условиях физиологических значений кислотности также способен реализовать описанный эффект на модельной системе — тест-культуре де-N-ацетилирующих свой ПГ бактерий.

#### Характеристика лизоцимрезистентности индигенных бифидобактерий

Культивирование исследуемых штаммов индигенных бифидобактерий (ICIS-216, ICIS-310, ICIS-505) в среде с лизоцимом и ацетатом аммония не показало существенного отличия их показателей роста ( $p > 0,05$ ) в контрольном бульоне от таковых в среде с добавлением максимальных использованных концентраций данных веществ (40 мкг/мл ли-

зоцима и 50 ммоль/л ацетата аммония):  $1,07 \pm 0,05$  и  $1,01 \pm 0,03$  ед. ОП у штамма ICIS-216;  $0,72 \pm 0,07$  и  $0,8 \pm 0,05$  ед. ОП у штамма ICIS-310;  $0,63 \pm 0,2$  и  $0,63 \pm 0,6$  ед. ОП у штамма ICIS-505 соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что устойчивость к лизоциму у индигенных бифидобактерий не связана с наличием ацетата в среде, что согласуется с механизмом обеспечения их лизоцимрезистентности при О-ацетилировании ПГ — избыток ацетата в среде не оказывает подавляющего влияния на реакцию ацетилирования.

### Обсуждение

Совокупность полученных данных свидетельствует, что продукция ацетата индигенными бифидобактериями обеспечивает не только уже известную устойчивость биотопа к ряду грамотрицательных патогенов, но и осуществляет дискриминацию неиндигенных грамположительных бактерий. При этом требуемый уровень данной продукции обеспечивается не только штаммами-носителями известных детерминант систем активного транспорта фруктозы, маннозы и рибозы, но и наблюдается у некоторых штаммов широко распространённого в кишечнике человека вида *B. bifidum*, не обладающего ими.

Проведённый анализ позволил нам составить схему механизма персистенции индигенных бифидобактерий (рис. 2):

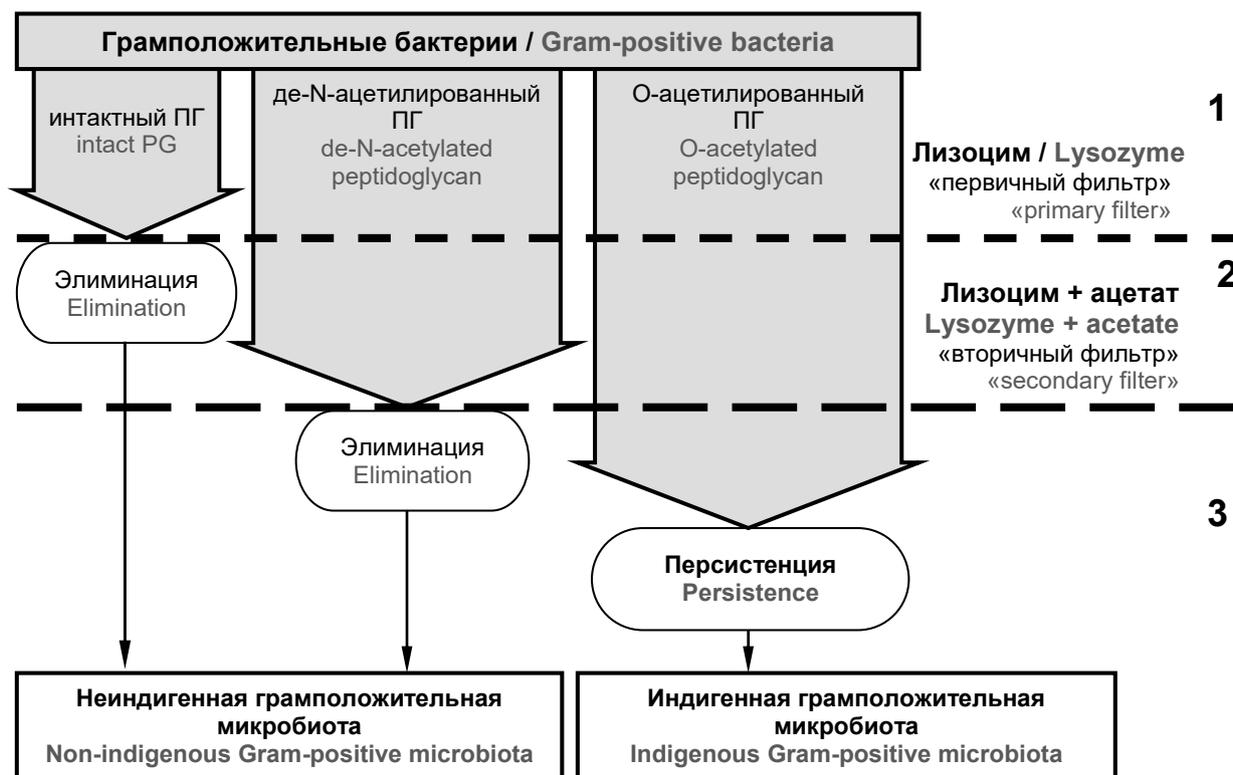


Рис. 2. Схема отбора грамположительных бактерий в толстом кишечнике по механизмам их лизоцим-резистентности.

Fig. 2. Selection of gram-positive bacteria in the large intestine by the mechanism of their lysozyme resistance.

1. Попадая в пищеварительный тракт, ПГ грамположительных бактерий напрямую контактирует с лизоцимом хозяина. Микроорганизмы с нативным, немодифицированным, ПГ элиминируются [15] — «первичный фильтр» микросимбионтов.

2. В толстом кишечнике бактерии, прошедшие лизоцимный, кислотный и протеолитический фильтры, в дополнение к лизоциму хозяина встречаются значительные количества ацетата, выделяемого индигенными бифидобактериями и их метаболитическими ассоциантами (бактероидами) [3]. Присутствие ацетата в среде смещает равновесие обратной реакции деацетилирования [11], катализируемой де-N-ацетилазой неиндигенной микробиоты в сторону немодифицированного ПГ бактерий, что оставляет его чувствительным к действию лизоцима [10], возвращаясь к элиминации его носителей — «вторичный фильтр» микросимбионтов.

К тому же, как показано нами, этот эффект наблюдался при физиологических концентрациях ацетата, образующихся в биотопе.

3. О-ацетилирование ПГ бактерий сохраняет свою работоспособность в присутствии ацетата и обеспечивает персистенцию реализующих его микроорганизмов, включая бифидобактерии [8], которые таким образом формируют пул индигенной микробиоты данного биотопа.

В связи с этим низкий уровень антилизоцимной активности, определяемый у бифидобактерий [2], оказывается закономерным, усиливая их селективное преимущество в толстом кишечнике. Таким образом, выделяясь в процессе катаболизма бифидобактериями, ацетат способствует изменению функционирования механизма персистенции бактерий-ассоциантов, выполняя по сути функцию регулятора лизоцимрезистентности в биотопе.

### Закключение

Выявлен механизм персистенции индигенной бифидофлоры через альтернативную модификацию ПГ микроорганизмов, где ацетат является ключевым регулятором, определяющим доминантную роль бифидобактерий в кишечном биотопе хозяина, обеспечивая как первичную дискриминацию неиндигенных кишечных ассоциантов через блокирование де-N-ацетилирования их ПГ, так и сохранение индигенной грамположительной микробиоты с О-ацетилированием ПГ. Учёт роли подобного биохимического регулятора в биоценозе может способствовать повышению эффективности мер по коррекции и предупреждению дисбиотических состояний.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ventura M., Turrone F., Lugli G.A., van Sinderen D. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to

- genomics perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 2014; 94(2): 163–8. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6356>
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. *Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека*. Екатеринбург; 2014.
3. Rios-Covian D., Cuesta I., Alvarez-Buylla J.R., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilán C.G. *Bacteroides fragilis* metabolises exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1): 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0773-9>
4. Fukuda S., Toh H., Taylor T.D., Ohno H., Hattori M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes.* 2012; 3(5): 449–54. <https://doi.org/10.4161/gmic.21214>
5. Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32(2): 149–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
6. Андрищенко С.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В. Молекулярные механизмы взаимодействия бактерий с лизоцимом и их роль в микросимбиозе. *Успехи современной биологии.* 2015; 135(5): 453–63.
7. Pfeffer J.M., Strating H., Weadge J.T., Clarke A.J. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3): 902–8. <https://doi.org/10.1128/jb.188.3.902-908.2006>
8. Sakurai T., Hashikura N., Minami J., Yamada A., Odamaki T., Xiao J.Z. Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacteria against lysozyme. *Anaerobe.* 2017; 47: 104–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.001>
9. Ho T.D., Williams K.B., Chen Y., Helm R.F., Popham D.L., Ellermeier C.D. Clostridium difficile extracytoplasmic function  $\sigma$  factor  $\sigma V$  regulates lysozyme resistance and is necessary for pathogenesis in the hamster model of infection. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2345–55. <https://doi.org/10.1128/IAI.01483-13>
10. Rae C.S., Geissler A., Adamson P.C., Portnoy D.A. Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways. *Infect. Immun.* 2011; 79(9): 3596–606. <https://doi.org/10.1128/iai.00077-11>
11. Aragunde H., Biarnés X., Planas A. Substrate recognition and specificity of chitin deacetylases and related family 4 carbohydrate esterases. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(2): 412. <https://doi.org/10.3390/ijms19020412>
12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград: Медгиз; 1962.
13. Sze M.A., Topçuoğlu B.D., Lesniak N.A., Ruffin M.T. 4<sup>th</sup>, Schloss P.D. Fecal short-chain fatty acids are not predictive of colonic tumor status and cannot be predicted based on bacterial community structure. *mBio.* 2019; 10(4): e01454-19.
14. Андрищенко С.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В., Бекпергенова А.В. Генетическая характеристика адаптивного потенциала бифидобактерий биотопа дистального отдела кишечника человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 95(4): 4–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-4-11>
15. Davis KM, Weiser JN. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect. Immun.* 2011; 79(2): 562–70. <https://doi.org/10.1128/IAI.00651-10>

### REFERENCES

1. Ventura M., Turrone F., Lugli G.A., van Sinderen D. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 2014; 94(2): 163–8. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6356>

2. Bukharin O.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. *Bifidoflora in Human Associative Symbiosis [Bifidoflora pri assotsiativnom simbioze cheloveka]*. Ekaterinburg; 2014. (in Russian)
3. Rios-Covian D., Cuesta I., Alvarez-Buylla J.R., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilán C.G. *Bacteroides fragilis* metabolises exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1): 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0773-9>
4. Fukuda S., Toh H., Taylor T.D., Ohno H., Hattori M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes.* 2012; 3(5): 449–54. <https://doi.org/10.4161/gmic.21214>
5. Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32(2): 149–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
6. Andryushchenko S.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Molecular mechanisms of bacterial interaction with lysozyme and their role in microbiocenosis. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2015; 135(5): 453–63. (in Russian)
7. Pfeiffer J.M., Strating H., Weadge J.T., Clarke A.J. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3): 902–8. <https://doi.org/10.1128/jb.188.3.902-908.2006>
8. Sakurai T., Hashikura N., Minami J., Yamada A., Odamaki T., Xiao J.Z. Tolerance mechanisms of human-residential bifidobacteria against lysozyme. *Anaerobe.* 2017; 47: 104–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.001>
9. Ho T.D., Williams K.B., Chen Y., Helm R.F., Popham D.L., Ellermeier C.D. Clostridium difficile extracytoplasmic function  $\sigma$  factor  $\sigma V$  regulates lysozyme resistance and is necessary for pathogenesis in the hamster model of infection. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2345–55. <https://doi.org/10.1128/IAI.01483-13>
10. Rae C.S., Geissler A., Adamson P.C., Portnoy D.A. Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways. *Infect. Immun.* 2011; 79(9): 3596–606. <https://doi.org/10.1128/iai.00077-11>
11. Aragunde H., Biarnés X., Planas A. Substrate recognition and specificity of chitin deacetylases and related family 4 carbohydrate esterases. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(2): 412. <https://doi.org/10.3390/ijms19020412>
12. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistic Methods in the Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)
13. Sze M.A., Topçuoğlu B.D., Lesniak N.A., Ruffin M.T. 4<sup>th</sup>, Schloss P.D. Fecal short-chain fatty acids are not predictive of colonic tumor status and cannot be predicted based on bacterial community structure. *mBio.* 2019; 10(4): e01454-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01454-19>
14. Andryushchenko S.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Bukharin O.V., Bekpergenova A.V. Genetic characteristics of the adaptive potential of bifidobacteria in the biotope of distal human intestine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(4): 4–11. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-4-11> (in Russian)
15. Davis K.M., Weiser J.N. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect. Immun.* 2011; 79(2): 562–70. <https://doi.org/10.1128/IAI.00651-10>

#### Информация об авторах

Бухарин Олег Валерьевич — д.м.н., академик РАН, научный руководитель Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>

Андрющенко Сергей Валерьевич<sup>✉</sup> — к.м.н., с.н.с. лаб. биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, [rattus000@gmail.com](mailto:rattus000@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-1691-7588>

Перунова Наталья Борисовна — д.м.н., проф. РАН, в.н.с. (с исполнением обязанностей зав. лаб.) лаб. биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>

Иванова Елена Валерьевна — д.м.н., доц., в.н.с. лаб. биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, Оренбург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 10.09.2020;  
принята к публикации 20.03.2021;  
опубликована 01.06.2021

#### Information about the authors

Oleg V. Bukharin — D. Sci. (Med.), Academician of the RAS, scientific director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, Orenburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>

Sergey V. Andryushchenko<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of biomonitoring and molecular genetic researches, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, [rattus000@gmail.com](mailto:rattus000@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-1691-7588>

Natalia B. Perunova — D. Sci. (Med.), Professor of RAS, leading researcher (with the duties of the Head of the laboratory), Laboratory of biomonitoring and molecular genetic researches, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, Orenburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>

Elena V. Ivanova — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of biomonitoring and molecular genetic researches, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the RAS, Orenburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 10.09.2020;  
accepted for publication 20.03.2021;  
published 01.06.2021