

11. De los Rios A., Grube M., Sancho L.G., Ascaso C. Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing Antarctic granite rocks // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – 59, N 2. – P. 386-395
12. Meynell G., Meynell E. Theory and Practice in Experimental Bacteriology. – Cambridge: At the University Press, 1965. – 471p.
13. Morita R.Y. Psychrophilic bacteria // Bacteriol. Rev. – 1975. – 39, N2 – P. 144-167.
14. Shivaji S., Reddy G.S.N., Suresh K., Gupta P., Chintalapati S., Schumann P., Stackebrandt E., Matsumoto, G.I. Psychrobacter vallis sp. nov. and Psychrobacter aquaticus sp. nov., from Antarctica // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – 55, N 2. – P. 757-762.
15. Vorobyova E., Soina V. The deep cold biosphere: facts and hypothesis // FEMS Microbiology Rev. – 1997. – 20, N3/4. – P. 277-290.
16. Yergeau E, Bokhorst S, Huiskes AH, Boschker HT, Aerts R, Kowalchuk GA. Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient // FEMS Microbiol Ecol. – 2007. – 59, N 2. – P. 436-451.

Отримано 15.02.2011

УДК 57.083.1+57.082.13+576.8.095.38

**Н.К. Коваленко, О.А. Полтавская, Л.Б. Зеленая**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д03680, Украина*

## **ВИДОВОЙ СОСТАВ БИФИДОБАКТЕРИЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ЛЮДЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП**

*Изучен количественный и видовой состав бифидофлоры содержимого дистального отдела кишечника людей различных возрастных групп. Установлено, что доминирующими видами кишечной бифидофлоры людей разного возраста являются виды *B. longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum* и *B. dentium*. Выявлена зависимость видового состава бифидобактерий кишечного содержимого от возраста человека. У людей пожилого возраста наблюдается уменьшение видового разнообразия бифидобактерий.*

*Ключевые слова:* кишечная микрофлора, бифидобактерии, видовой состав.

Бифидобактерии занимают важное место в микробиоценозе пищеварительного тракта здорового человека. Это, в первую очередь, обусловлено особенностями их метаболизма. Бифидобактерии являются той физиологической основой, которая формирует нормальную микрофлору ребенка с первых дней его жизни. В процессе старения организма количество бифидофлоры может уменьшаться в связи с возрастными метаболическими изменениями.

Видовой состав бифидобактерий пищеварительного тракта, в частности, здоровых детей изучен достаточно полно. Вместе с тем, под влиянием различных факторов, в том числе, респираторных и кишечных инфекций, наблюдаются дисбиотические изменения в составе микрофлоры.

В доступной литературе практически не представлены сравнительные данные о видовом составе бифидобактерий в пищеварительном тракте людей различных возрастных групп. Имеющиеся сведения касаются в основном изучения возможности использования этих микроорганизмов в составе биопрепаратов и продуктов питания с целью нормализации микробиоценоза.

Целью данной работы было исследовать в сравнительном аспекте видовой состав бифидобактерий содержимого дистального отдела кишечника людей разных возрастных групп.

**Материалы и методы.** Объектом исследования были люди различных возрастных групп: здоровые и больные дети 2-3 лет (по 10 образцов), люди среднего возраста (30-35 лет) (10 образцов) и пожилого возраста (63-84 года) (15 образцов). Исследования проводили на базе Института геронтологии АМН Украины, а также Института педиатрии, акушерства и гинекологии АМН Украины, г. Киев.

© Н.К. Коваленко, О.А. Полтавская, Л.Б. Зеленая, 2012

Для оценки общего состояния микробиоты дистального отдела кишечного тракта использовали фекалии, отобранные с соблюдением правил асептики. Навеску 1 г фекалий суспендировали в 9 мл физиологического раствора, готовили серийные разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$  и высевали на агаризованную среду MRS для выделения лактобактерий, на среду Эндо для выявления *E. coli*, на бромтимоловый лактозный агар для выделения лактозонегативных энтеробактерий. Для выделения стафилококков использовали стафилококковый агар, на среде Сабуро выделяли дрожжеподобные грибы. Бактерии, образующие споры, выделяли (после прогрева разведений в физиологическом растворе при 80 °С в течение 20 мин) на мясопептонном агаре. *Proteus vulgaris* выделяли на скошенном мясопептонном агаре. Для установления гемолитической активности бактерий использовали кровяной агар с 5 % содержанием эритроцитов барана.

Посевы инкубировали в течение 24-48 часов при температуре 37 °С, а дрожжеподобные грибы – в течение 5 суток при 28°С. Количественное содержание условно патогенных микроорганизмов в исследуемом материале устанавливали путем подсчета колоний, выросших на дифференциально-диагностических средах и выражали количеством колониеобразующих единиц в 1 г фекалий (КОЕ/г). За норму принимали показатели (количество КОЕ в 1 г фекалий), представленные в Методических рекомендациях к микробиологической диагностике дисбактериозов [2].

Для выделения бифидобактерий 0,1 мл из разведений фекалий  $10^1$ - $10^{10}$  высевали на поверхность агаризованной среды MRS с 0,05 % цистеина (среда MRSC). Культивировали при 37°С 24-48 часов в анаэробных условиях с использованием анаэробной системы Gen Box (BioMerieux, Франция). Для получения чистых культур бифидобактерий типичную колонию отсеивали в MRSC бульон, культивировали при 37°С 24-48 часов в анаэробных условиях, после чего делали высев культуры на модифицированный MRSC-агар «истоющим штрихом». Пересев отдельной колонии с MRSC-агара в MRSC-бульон повторяли не менее 10 раз.

Принадлежность изолированных культур к роду *Bifidobacterium* устанавливали путем исследования морфологии клеток и колоний бифидобактерий, каталазной и нитратазной активности, подвижности и образования газа из глюкозы [3]. Наличие фруктозо-6-фосфат фосфокетолазы в клеточном экстракте бифидобактерий определяли по методу *V. Scardovi* в модификации *J.I. Orban* и *J.A. Patterson* [12,10].

С целью идентификации исследуемых штаммов бифидобактерий также использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Геномную ДНК выделяли из клеточной суспензии с использованием набора для выделения ДНК («Амплисенс», Россия), согласно рекомендациям производителя. Амплификацию осуществляли на термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР соответствовали приведенным в работах *Matsuki* с соавт. [8] и *Mullie* с соавт. [9]. Продукты амплификации разделяли в 1,7 % агарозном геле, который содержал 0,01 % бромистого этидия. Результаты визуализировали в УФ-свете.

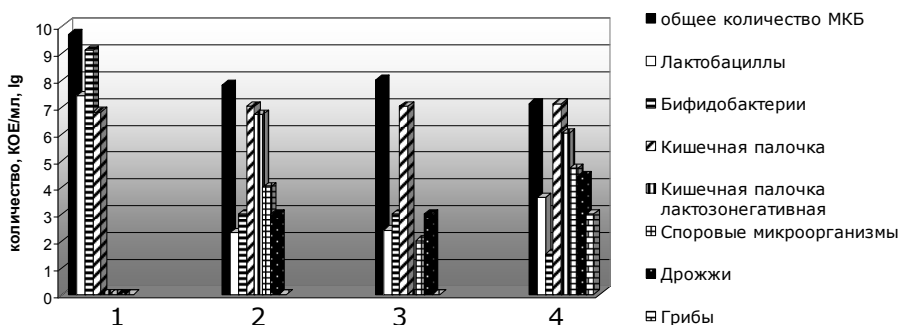
Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета компьютерной программы «Excel XP» по общепринятым методикам, уровень вероятности составлял 95 % [1].

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что на количественный и видовой состав нормальной микрофлоры кишечника влияет общее состояние организма человека, в частности, его иммунный статус [5]. В ходе изучения количественного состава бифидобактерий нами были проведены сравнительные исследования микробиоценоза кишечного содержимого здоровых и больных детей, а также людей среднего и пожилого возраста.

Нормальные показатели количественного и видового состава микрофлоры кишечника наблюдались лишь у здоровых детей (рис. 1). Так, содержание молочнокислых бактерий (МКБ), бифидобактерий, лактозопозитивной кишечной палочки в фекалиях было в пределах нормы ( $(9,7 \pm 0,92)$ lg,  $(9,1 \pm 0,53)$ lg и  $(6,8 \pm 0,33)$ lg КОЕ/мл соответственно), факультативных условно патогенных микроорганизмов обнаружено не было.

Известно, что антибактериальные препараты, которые применяются при лечении пневмонии, приводят к дисбиозу кишечника. В частности, Шамсиев Ф.М. с соавт. при изучении микробиоценоза кишечника при острой осложненной пневмонии у детей раннего возраста

наблюдали микробиологические нарушения в 91,1 % случаев, причем у 46,6 % – дисбактериоз III степени [4]. Полученные нами результаты согласуются с вышеприведенными данными: у детей больных пневмонией наблюдались значительные отклонения от нормы в показателях состава кишечной микрофлоры в сторону уменьшения содержания бифидобактерий и лактобацилл ( $(3 \pm 0,00) \text{lg}$  и  $(2,3 \pm 0,94) \text{lg}$  КОЕ/мл, соответственно) и увеличения содержания кишечной палочки со слабовыраженными ферментативными свойствами ( $(6,7 \pm 0,78) \text{lg}$  КОЕ/мл), наблюдалось повышенное, по сравнению с нормальным, содержание споровых микроорганизмов и дрожжей ( $(4,0 \pm 0,00) \text{lg}$  и  $(3,0 \pm 0,00) \text{lg}$  КОЕ/мл, соответственно).



**Рис. 1. Состав микрофлоры кишечника людей разных возрастных групп.**

1 – здоровые дети, 2 – больные дети, 3 – люди среднего возраста, 4 – люди пожилого возраста.

$$p < 0,05.$$

У здоровых людей среднего возраста наблюдалось снижение содержания лактобацилл и бифидобактерий ( $(2,4 \pm 0,61) \text{lg}$  и  $(3,0 \pm 0,00) \text{lg}$  КОЕ/мл, соответственно), а общий пул молочнокислых бактерий поддерживался на уровне нормы за счет кокковых форм ( $(8,0 \pm 0,85) \text{lg}$  КОЕ/мл).

Значительные отклонения в показателях кишечной микрофлоры наблюдались у людей пожилого возраста. Так, было увеличено содержание кишечной палочки со слабовыраженными ферментативными свойствами ( $(6,0 \pm 0,53) \text{lg}$  КОЕ/мл), споровых микроорганизмов, дрожжей и грибов ( $(4,7 \pm 0,46) \text{lg}$  и  $(4,4 \pm 0,15) \text{lg}$  КОЕ/мл соответственно). Наблюдалось снижение общего содержания молочнокислой микрофлоры, которая была представлена в основном кокковыми формами ( $(7,1 \pm 0,24) \text{lg}$  КОЕ/мл), что свидетельствует о дисбактериозе кишечника I-II степени.

Известно, что микроорганизмы рода *Bifidobacterium* являются одними из наиболее важных представителей микробиоты пищеварительного тракта здорового человека. Согласно современным данным, они играют основную роль в поддержании нормального физиологического состояния микрофлоры кишечника, имеют сахаролитический тип метаболизма и не обладают патогенными свойствами [11]. Кроме того, известно, что в поддержании гомеостаза большое значение имеет не только количественный, но и видовой состав этих микроорганизмов. В частности, большое видовое разнообразие нормофлоры обеспечивает ей потенциально высокую адаптационную способность к изменениям в окружающей среде.

Для исследования видового состава бифидобактерий содержимого дистального отдела кишечника людей различных возрастных групп, проживающих в г. Киеве, нами было выделено 129 штаммов бифидобактерий. Изначально штаммы отбирали по способности расти на среде MRS с цистеином и по морфологии клеток и колоний (табл. 1). В дальнейшем нами были изучены фенотипические свойства, характерные для рода *Bifidobacterium*, с использованием общепринятых микробиологических методов. Согласно исследованным свойствам все штаммы были отнесены к роду *Bifidobacterium*.

Для подтверждения полученных данных нами был проведен ПЦР-анализ с использованием родоспецифичных праймеров следующих последовательностей: (Bif164-f): 5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3' и (Bif662-r): 5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3'. Эта пара праймеров, по данным многих авторов, имеет высокую специфичность к 16S рДНК [8,9]. В результате ПЦР-реакции для всех штаммов бифидобактерий были получены ПЦР-продукты

молекулярной массы 520 пар нуклеотидов, что подтвердило принадлежность этих штаммов к роду *Bifidobacterium* (рис. 2).

Таблица 1

**Фенотипические признаки изученных штаммов бифидобактерий**

Метод исследования	Результат
морфология клеток	палочки, 0,5 – 1,3 x 1,5 – 8,0 мкм, обычно выгнутые, булабовидные, часто разветвленные, переменные по расположению
морфология колоний	кремовые круглые, с ровным краем, пастообразной консистенции, 1-2 мм в диаметре
окраска по Граму	грамположительные
рост в анаэробных условиях	+
рост в аэробных условиях	-
каталазная активность	-
нитратная активность	-
подвижность	-
образование газа из глюкозы	-
наличие фруктозо-6-фосфат фосфокетолазы	+

Для видовой идентификации выделенных штаммов бифидобактерий нами была проведена множественная амплификация с праймерами к 12 видам представителей рода *Bifidobacterium*.

Такой метод множественной ПЦР (мультиплекс-ПЦР) позволяет определить одновременно несколько видов бактерий, присутствующих в образце, в результате проведения только одной реакции. Мультиплекс-ПЦР значительно ускоряет и упрощает процесс идентификации.

Было показано, что видовой состав бифидобактерий, изолированных от здоровых и больных детей, представлен 4-мя видами, причем доминирующими являются виды *B. longum subsp. infantis* и *B. bifidum* (табл. 2).

Видовое разнообразие кишечной бифидофлоры людей среднего возраста насчитывает также 4 вида, однако их состав отличается от «детского»: доминирующими видами были *B. breve*, а также *B. longum subsp. longum*, отсутствующий у детей.

Штаммы, выделенные от людей старших возрастных групп, были представлены только двумя видами – *B. dentium* и *B. bifidum*.

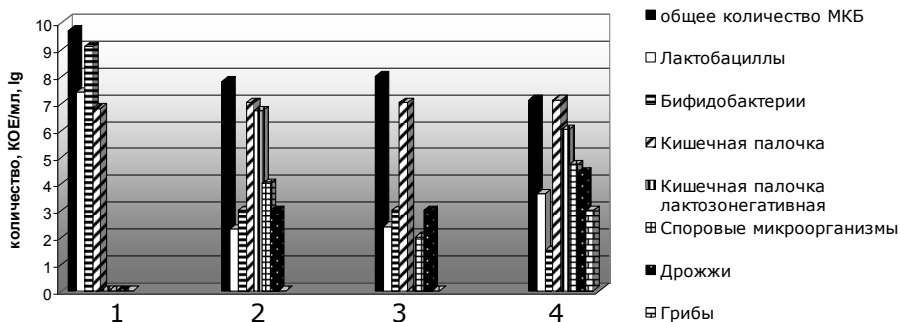


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации с родо- и видоспецифическими праймерами и ДНК, выделенной из бифидобактерий: М – маркер молекулярной массы DNA ladder mix; 1, 4 – *B. bifidum* (277 п.н.), 2 – *B. breve* (568 п.н.), 3 – *B. longum* (831 п.н.), 11 – *Bifidobacterium sp.* (549-563 п.н.).

Полученные нами результаты отличаются от данных других авторов. Так, из литературных источников известно, что при исследовании бифидофлоры у детского населения Европы чаще выделяются виды *B. breve* и *B. adolescentis*, а вид *B. longum subsp. infantis*, напротив, выделяется довольно редко [7]. Не F. с соавт. показали, что у взрослого населения Финляндии чаще всего выделяются виды *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum subsp. infantis*, и *B. longum subsp. longum*, а у пожилых людей – *B. adolescentis* и *B. longum subsp. longum* [6]. Согласно данным японских исследователей, бифидофлора взрослого населения азиатских стран представлена в основном видами *B. catenulatum* и *B. longum subsp. longum* [8].

При изучении видового состава бифидобактерий пищеварительного тракта обследованного контингента мы не обнаружили виды *B. adolescentis* и *B. catenulatum*. Кроме того, по нашим данным, вид *B. longum subsp. infantis* являлся доминирующим в бифидофлоре детей. Такие различия в доминирующем составе бифидофлоры могут быть связаны как с питанием населения и экологическими условиями, так и с возрастной категорией.

Таблица 2

Видовой состав исследуемых штаммов бифидобактерий

Источник выделения	Количество выделенных штаммов	Виды
Здоровые дети	113	<i>B. longum subsp. infantis</i> (67%) <i>B. bifidum</i> (23%)
Больные дети	36	<i>B. breve</i> (8%) <i>B. animalis</i> (2%)
Люди среднего возраста	19	<i>B. longum subsp. longum</i> (40%) <i>B. breve</i> (31%) <i>B. bifidum</i> (23%) <i>B. animalis</i> (6%)
Люди пожилого возраста и старики	28	<i>B. dentium</i> (95%) <i>B. bifidum</i> (5%)

Известно, что бифидофлора кишечника здорового взрослого человека представлена одновременно 4-6 видами [5,11]. Кроме того, было показано, что старение организма человека часто сопровождается изменениями видового состава фекальной микрофлоры, в частности снижение числа анаэробных видов микроорганизмов и особенно представителей молочно-кислых бактерий [6]. Нами было установлено, что у стариков наблюдалось уменьшение не только количественного, но и видового состава бифидобактерий, которые были представлены лишь 1-2 видами. Кроме того, было обнаружено, что бифидофлора людей пожилого возраста представлена в основном видом *B. dentium*. Различия в видовом составе бифидобактерий людей среднего и старшего возраста можно объяснить возрастными изменениями процессов пищеварения. Следует также отметить, что по данным литературы, основным местом обитания вида *B. dentium* является ротовая полость. Кроме того, представители данного вида обладают высокой адаптивной способностью к различным условиям окружающей среды [13]. Можно предположить, что при снижении количественного и видового состава бифидобактерий в кишечнике пожилых людей вид *B. dentium* занимает свободную экологическую нишу.

Таким образом, проведенные исследования показали, что видовой состав микробиоценоза кишечника человека зависит от его возраста, состояния здоровья и питания. Видовой состав бифидобактерий отличается как возрастными, так и региональными особенностями.

**Коваленко Н.К., Полтавська О.А., Зелена Л.Б.**

*Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, Д03680, Україна*

## ВИДОВИЙ СКЛАД БІФІДОБАКТЕРІЙ ТРАВНОГО ТРАКТУ ЛЮДЕЙ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП

Резюме

Вивчено кількісний та видовий склад біфідофлори вмісту дистального відділу кишечника людей різних вікових груп. Встановлено, що домінуючими видами кишкової біфідофлори людей різного віку

є види *B. longum subsp. infantis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum subsp. longum* і *B. dentium*. Виявлено залежність видового складу біфідобактерій кишкового вмісту від вікової групи людини. У людей похилого віку спостерігається зменшення видового різноманіття біфідобактерій.

Ключові слова: кишкова мікрофлора, біфідобактерії, видовий склад.

**N.K. Kovalenko, O.A. Poltavska, L.B. Zelena**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **BIFIDOBACTERIAL SPECIES COMPOSITION OF DIGESTIVE TRACT OF PEOPLE OF DIFFERENT AGE GROUPS**

### **S u m m a r y**

The quantitative and species composition of bifidoflora of intestinal content of people of different age groups has been studied. It was established that *B. longum subsp. infantis*, *B. bifidum*, *B. brev.*, *B. longum subsp. longum* and *B. dentium* were the dominant species of intestinal bifidoflora of people of all ages. The dependence of the species composition of intestinal bifidobacteria on the human age was shown. A decrease of species diversity of bifidobacteria in elderly people was observed.

The paper is presented in Russian.

**К е у w o r d s:** intestinal microflora, bifidobacteria, species composition.

**Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** Kovalenko N.K., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
2. Микробиологическая диагностика дисбактериозов: Методические рекомендации / Знаменский В.А., Дегтяр Н.В., Кузьминский С.Н. и др. – Киев, 1986. – 27 с.
3. Полтавська О.А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2006. – 21 с.
4. Шамсиев Ф.М., Хайдарова М.М., Нурматов Б.А., Ша-Ахмедова Л.Р. Микробиоценоз толстой кишки при острой осложненной пневмонии у детей // ЖМЭИ. – 2001. – № 1. – С. 67–69.
5. Biavatti B., Vescovo M., Torriani S., Botazzi V. Bifidobacteria: ecology, physiology and applications // Ann. Microbiol. – 2000. – **50**, N 1. – P. 117 – 131.
6. He F., Ouwehand A.C., Isolauri E. et al. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors // Curr. Microbiol. – 2001. – **43**, N 4. – P. 351 – 354.
7. Hebuterne X. Gut changes attributed to ageing: effect on intestinal microflora // Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2003. – **6**, N 1. – P. 3 – 7.
8. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J. et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – **68**, N 5. – P. 5445 – 5451.
9. Mullie C., Odou M.-F., Singer E. et al. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin // FEMS Microbiology Letters. – 2003. – N 222. – P. 129 – 136.
10. Orban J.J., Patterson J.A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria // J. Microbiol. Methods. – 2000. – **40**, N1. – P. 221 – 224.
11. Reuter G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession // Curr. Issues Intest. Microbiol. – 2001. – N 2. – P. 43–53.
12. Scardovi V. Genus *Bifidobacterium*. Orla-Jensen // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. – P. 1418 – 1434.
13. Ventura M., Turroni F., Zomer A. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity // PLoS Genet. – 2009. – **5**, N 12 (e1000785). – P. 1 – 18.

Отримано 17.02.2011