

DOI: 10.15690/vramn.v70.i4.1409

А.В. Чаплин¹, А.Г. Бржозовский¹, Т.В. Парфёнова², Л.И. Кафарская¹, Н.Н. Володин³,
А.Н. Шкопоров¹, Е.Н. Ильина², Б.А. Ефимов¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Российская Федерация

² НИИ физико-химической медицины, Москва, Российская Федерация

³ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва, Москва,
Российская Федерация

Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bifidobacterium* кишечной микрофлоры с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии

Представители рода *Bifidobacterium* представляют значительную часть микрофлоры кишечника взрослых людей и численно доминируют в микрофлоре младенцев. Известно, что видовой состав кишечных бифидобактерий подвергается сильным изменениям с возрастом, однако многие детали этого процесса остаются неясными. **Цель исследования:** изучить видовое разнообразие бифидобактерий кишечника и изменения их качественного и количественного состава в процессе взросления человека при помощи технологии MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа белковых профилей чистых культур. **Методы:** кросс-секционное исследование разнообразия бифидобактерий в составе нормальной микрофлоры кишечника проведено у 93 человек в возрасте от 1 мес до 57 лет. Осуществляли выделение чистых культур и их идентификацию на приборе Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Германия), подтверждение результатов с использованием секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. **Результаты:** с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии было успешно идентифицировано 93% выделенных штаммов бифидобактерий. Минимум по 2 представителя от каждого из видов были дополнительно определены методом секвенирования фрагмента гена 16SpРНК; во всех случаях результаты методов совпали. Показано, что с возрастом происходит снижение общей концентрации бифидобактерий ($p < 0,001$), уменьшается встречаемость видов *Bifidobacterium bifidum* ($p = 0,020$) и *Bifidobacterium breve* ($p < 0,001$), а встречаемость вида *Bifidobacterium adolescentis* увеличивается ($p < 0,001$), отражая постепенные процессы перестройки микрофлоры. **Заключение:** метод MALDI-TOF масс-спектрометрии показал возможность быстрой и надежной идентификации бифидобактерий, позволившей провести исследование изменений количественных и качественных показателей микрофлоры человека в процессе взросления.

Ключевые слова: бифидобактерии, масс-спектрометрия, микрофлора кишечника.

(Для цитирования: Чаплин А.В., Бржозовский А.Г., Парфёнова Т.В., Кафарская Л.И., Володин Н.Н., Шкопоров А.Н., Ильина Е.Н., Ефимов Б.А. Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bifidobacterium* кишечной микрофлоры с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (4): 435–440. Doi: 10.15690/vramn.v70.i4.1409)

435

A.V. Chaplin¹, A.G. Brzhozovskii¹, T.V. Parfenova², L.I. Kafarskaia¹, N.N. Volodin³,
A.N. Shkoporov¹, E.N. Ilina², B.A. Efimov¹

¹ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

² Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

³ D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Moscow, Russian Federation

Species Diversity of *Bifidobacteria* in the Intestinal Microbiota Studied Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry

Background: The members of genus *Bifidobacterium* represent a significant part of intestinal microbiota in adults and predominate in infants. Species repertoire of the intestinal bifidobacteria is known to be subjected to major changes with age; however, many details of this process are still to be elucidated. **Objective:** Our aim was to study the diversity of intestinal bifidobacteria and changes of their qualitative and quantitative composition characteristics during the process of growing up using MALDI-TOF mass-spectrometric analysis of pure bacterial cultures. **Methods:** A cross-sectional study of bifidobacteria in the intestinal microbiota was performed in 93 healthy people of the ages from 1 month to 57 years. Strains were identified using Microflex LT MALDI-TOF MS, the confirmation was performed by 16S rRNA gene fragment sequencing. **Results:** 93% of isolated bifidobacterial strains were successfully identified using MALDI-TOF mass-spectrometry. At least two of the strains from each species were additionally identified by 16S rRNA gene fragment sequencing, in all of the cases the results were the same. It was shown that the total concentration of bifidobacteria decreases with age ($p < 0.001$) as well as the frequency of isolation of *Bifidobacterium bifidum* ($p = 0.020$) and *Bifidobacterium breve* ($p < 0.001$), and the frequency of isolation of *Bifidobacterium adolescentis*, increases ($p < 0.001$), representing the continuous process of transformation of microbiota. **Conclusion:** The method of MALDI-TOF mass spectrometry demonstrated the ability to perform rapid and reliable identification of bifidobacteria that allowed the study of changes in the quantitative and qualitative characteristics of human microbiota in the process of growing up.

Key words: bifidobacteria, mass-spectrometry, intestinal microbiota.

(For citation: Chaplin A.V., Brzhozovskii A.G., Parfenova T.V., Kafarskaia L.I., Volodin N.N., Shkoporov A.N., Ilina E.N., Efimov B.A. Species Diversity of Bifidobacteria in the Intestinal Microbiota Studied Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (4): 435–440. Doi: 10.15690/vramn.v70.i4.1409)

Обоснование

Микрофлора желудочно-кишечного тракта человека, и в первую очередь толстого кишечника, на протяжении многих лет привлекает внимание исследователей из-за своего выраженного влияния на гомеостаз человеческого организма [1, 2]. Наиболее заметной ее ролью является создание колонизационной резистентности, предотвращающей заселение кишечника патогенными микроорганизмами за счет синтеза веществ, подавляющих их рост, а также конкуренции за питательные вещества и места для адгезии [1]. Микрофлора кишечника также участвует в синтезе ряда витаминов, всасывающихся через кишечную стенку и участвующих в метаболизме. Их примерами могут служить витамин К, биотин и фолиевая кислота [3]. Синтезируемые бактериями нормальной микрофлоры короткоцепочечные жирные кислоты способны абсорбироваться в кишечнике, служат дополнительным источником энергии, а также участвуют в стимуляции пролиферации и дифференцировки кишечного эпителия и являются участниками сложной сети взаимодействий микрофлоры с иммунной системой [4]. Показано, что кишечная флора индуцирует образование Т-регуляторных клеток, и в ряде исследований была продемонстрирована ассоциация изменений в ее составе с развитием atopических заболеваний, а также некротизирующего энтероколита [5]. Значительное внимание в настоящее время уделяют механизмам и эффектам взаимодействия кишечной микрофлоры с энтеральным и парасимпатическим отделами нервной системы, через которые возможно опосредованное влияние на процессы в центральной нервной системе [6, 7].

Одной из наиболее изученных групп бактерий нормальной микрофлоры кишечника человека являются представители рода *Bifidobacterium*. Это грамположительные облигатно анаэробные бактерии, производящие молочную и уксусную кислоту в качестве основных конечных продуктов брожения. У детей до 2 лет бифидобактерии являются численно преобладающими в микрофлоре толстой кишки по сравнению с другими микроорганизмами [8]; максимум относительной численности бифидобактерий наблюдается в 3 мес [9]. Показано, что у детей, находящихся на искусственном вскармливании, количество бифидобактерий в микрофлоре кишечника значительно снижено по сравнению с детьми на грудном вскармливании [10]. С возрастом количественный и качественный состав микрофлоры кишечника претерпевает значительные изменения: в частности, доля бифидобактерий снижается до 1–5% [11].

Среди представителей рода *Bifidobacterium* колонизировать слизистую оболочку кишечника человека способны виды *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum* и *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Также иногда могут быть обнаружены *Bifidobacterium gallicum* и *Bifidobacterium kashiwanohense* [12]. Видовой состав бифидобактерий в кишечной микрофлоре обладает значительной внутривидовой изменчивостью, а также меняется в зависимости от возраста. Наиболее представлен в численном плане в микрофлоре детей и взрослых вид *B. longum* [8, 13, 14]. В одном из исследований было обнаружено, что значительная часть бифидобактерий в микрофлоре младенцев представлена бактериями видов *B. pseudocatenulatum* и *B. adolescentis* [14], но другие работы не подтверждают этих наблюдений [8, 13]. Также значительно варьирует, вплоть

до отсутствия их обнаружения в некоторых исследованиях, представленность видов *B. bifidum*, *B. catenulatum* и *B. pseudolongum*. Причинами таких расхождений могут являться межпопуляционные различия и различия в наборе групп, малые выборки, использование описательной статистики без установления значимости различий, а также варьируемые методы исследования микрофлоры.

Выбор оптимальной методологии исследования микроорганизмов, колонизирующих кишечник человека, до настоящего времени остается проблемой, не имеющей однозначного решения [15]. В последние годы широко применяются подходы, основанные на метагеномном анализе тотальной ДНК либо на анализе амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК из биологических образцов с помощью технологий высокопроизводительного секвенирования. Эти технологии позволяют получать информацию о видовом разнообразии как культивируемых, так и некультивируемых бактерий в составе микрофлоры. Вместе с тем они имеют и ряд недостатков: затруднена оценка фенотипических свойств бактерий, почти невозможно получение информации об отдельных штаммах одного вида, одновременно присутствующих в микрофлоре, сложность и дороговизна этих технологий лимитируют получение данных на больших выборках. Другим вариантом изучения микрофлоры человека является классический бактериологический метод, представляющий собой выделение чистых культур и их идентификацию. Он ограничивает спектр определяемых микроорганизмов только культивируемыми видами, однако позволяет проводить детальные исследования выделенных штаммов. Существуют различные методы, обеспечивающие определение выделенных бактерий до уровня вида. До последнего времени наиболее часто применялась биохимическая идентификация по набору ферментативных активностей с использованием готовых тест-систем, однако многие известные виды, в т.ч. и бифидобактерий, невозможно точно разделить с использованием данного подхода [16]; также применение этого метода является относительно дорогостоящим, что затрудняет его масштабирование на большое число идентифицируемых штаммов. Проблема высокой стоимости и трудоемкости возникает и при использовании современных молекулярно-генетических методов идентификации, в частности секвенирования генов 16S рРНК чистых культур бактерий [17].

В последние годы в бактериологии все шире начинают применять метод видовой идентификации, основанный на времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией-ионизацией при содействии матрицы (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS). В этом методе выделенные белковые экстракты либо непосредственно бактериальные клетки смешивают с насыщенным раствором вещества-матрицы, что приводит к их совместной кристаллизации. Лазерный импульс вызывает ионизацию и взрывное испарение матрицы вместе с исследуемыми белками. Образующиеся ионы разгоняются в безвоздушной среде электростатическим полем, после чего пролетают через участок без ускорения и врезаются в мишень детектора; при этом прибор регистрирует время пролета ионов, которое будет отражать их массово-зарядовое соотношение. Таким образом, метод MALDI-TOF масс-спектрометрии позволяет регистрировать белковый спектр чистой культуры бактерий, который при сравнении с базой данных дает возможность провести идентификацию с точностью до вида. Данная технология позволяет анализировать большое число бактериальных штаммов быстро, с высокой точностью, а также, учитывая

стоимость только расходных материалов, значительно дешевле других методов [17].

Целью нашего исследования было проанализировать видовой состав бифидобактерий микрофлоры кишечника детей разных возрастов и взрослых людей при помощи чистых культур и их идентификации с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и секвенирования генов 16S рРНК.

Методы

Дизайн исследования

Проведено кросс-секционное исследование.

Критерии соответствия

Изучение качественного и количественного состава бифидобактерий толстого кишечника проводили у лиц обоего пола во всем диапазоне возрастов. Обследуемые на момент исследования не принимали анти-, про- или пребиотики.

Условия проведения

Исследование проведено на базе кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва).

Продолжительность исследования

Материал брали однократно; наблюдений за состоянием обследуемых или исследования в динамике в рамках данной работы не проводили.

Методы регистрации результатов

Материалом для исследования служили фекалии, которые собирали стерильным шпателем и помещали в транспортный контейнер. В бактериологической лаборатории из исследуемого материала готовили серийные разведения в физиологическом растворе и высевали аликвоты в количестве 0,1 мл из разведений исследуемого материала 10^5 и 10^7 раз на чашки Петри со средой *Bifidobacterium agar* (Himedia Labs Inc., Индия). Чашки с посевами инкубировали в микроанаэробных условиях (Oxoid, Великобритания), заполненных газовой смесью (85% N_2 , 10% H_2 , 5% CO_2) при 37 °C в течение 48 ч. Все морфологические типы колоний подсчитывали и культивировали независимо. Первичный скрининг штаммов осуществляли бактериоскопическим методом с использованием окраски по Граму. Штаммы, характеризующиеся типичной морфологией бифидобактерий, лиофилизировали в растворе сахарозы (10%) и желатина (1%) в лиофильной сушке SB1 (Chemlab, Бельгия). Все последующие манипуляции с чистыми культурами бифидобактерий осуществляли после выделения культур из лиофилизированных образцов.

Для выделения белков чистые культуры бактерий ресуспендировали в 300 мкл деионизованной воды, после чего добавляли 900 мкл 70% этанола. Далее проводили центрифугирование в течение 2 мин при 10 тыс. об./мин; супернатант удаляли. В осадок, просушенный на воздухе, добавляли 70% муравьиную кислоту в объеме 25–50 мкл. После 3 мин инкубации добавляли равный объем ацетонитрила, смесь перемешивали, затем центрифугировали 2 мин при 10 тыс. об./мин.

Супернатант с экстрагированными белками в объеме 1 мкл наносили на мишень. После высушивания образец сверху покрывали матрицей, состоящей из насыщенного раствора α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в раство-

ре 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. После этого была проведена масс-спектрометрия с использованием прибора Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Германия). Анализ спектров осуществляли с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). Учитывали только значения, рейтинг (score) которых составлял $\geq 1,7$.

Штаммы бифидобактерий, видовую принадлежность которых не удалось установить при помощи метода MALDI-TOF масс-спектрометрии, были идентифицированы путем секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. Кроме того, этот же метод использовали выборочно для подтверждения правильности видовой идентификации бифидобактерий методом масс-спектрометрии. Для определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли амплификацию участка, соответствующего фрагменту размером 493 п.н. в *Escherichia coli*, с использованием универсальных бактериальных праймеров UF1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и UR1 (5'-GCTGGCACGCTAGTTAGCC-3') в течение 35 циклов со следующей программой: денатурация — 94 °C, 20 с; отжиг праймеров — 58 °C, 20 с; элонгация — 72 °C, 30 с. Полученный ПЦР-продукт очищали с использованием ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit (Zymo Research, США). Для постановки реакции секвенирования по Сэнгеру с праймера UF1 использовали набор реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham, Великобритания). Продукты реакции анализировали при помощи автоматического секвенатора ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и набора программного обеспечения к нему. Определение границ отсечения последовательностей по качеству электрофореграммы осуществляли визуально с использованием программы Chromas Lite. Видовую принадлежность бифидобактерий устанавливали на основе поиска полученных последовательностей нуклеотидов в базе данных GenBank при помощи алгоритма BLAST.

Этическая экспертиза

В соответствии с заключением Этического комитета РНИМУ им. Н.И. Пирогова от 25.03.15 г., данное исследование не подлежит этической экспертизе согласно СОП ЭК РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Размер выборки предварительно не рассчитывали.

Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку данных осуществляли с применением программного пакета R. Для анализа встречаемости видов использовали критерий Манна–Уитни, в котором в качестве непрерывной переменной выступал возраст обследуемого, а в качестве дискретной — наличие или отсутствие представителей данного вида среди выделенных от пациента штаммов. Использование критерия Манна–Уитни стало возможно вследствие его эквивалентности тесту на нулевую ранговую бисериальную корреляцию [18]. Анализ численности бифидобактерий осуществляли с применением регрессионного анализа. Проверку на нормальность распределения остатков и гомоскедастичность проводили с помощью визуальной оценки квантиль-квантильных графиков и графиков остаток–предсказание, соответственно. Для введения поправок на множественные сравнения использовали метод Бонферрони. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Участники исследования

Изучение качественного и количественного состава бифидобактерий толстого кишечника проведено у 93 практически здоровых людей обоего пола [30 (32%) мужского и 63 (68%) женского]. Разброс возраста составлял от 1 мес до 57 лет, при этом дети до 2 лет составляли 33% от общей выборки.

Основные результаты исследования

Суммарно в результате исследования было выделено 260 штаммов бактерий, из которых для 220 была подтверждена принадлежность к роду *Bifidobacterium*. Если в ходе исследования оказывалось, что два или более штамма, выделенных от одного обследуемого, относятся к одному виду, то их рассматривали как один штамм. При этом их концентрация суммировалась. Окончательное число штаммов бифидобактерий в работе составило 187. С использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии успешно идентифицировано 93% выделенных штаммов бифидобактерий. В 7% случаев результат масс-спектрометрической идентификации определялся как ненадежный (score <1,7); в этом случае проводили идентификацию с использованием секвенирования гена 16S рНК.

Дополнительно минимум по 2 представителя от каждого из видов были проанализированы параллельно методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и секвенированием фрагментов гена 16S рНК; во всех случаях результаты совпали.

Среди выделенных штаммов кишечных бифидобактерий (n=187) было идентифицировано 44 штамма *B. adolescentis*, 65 *B. longum*, 31 *B. bifidum*, 13 *B. catenulatum*, 7 *B. pseudocatenulatum*, 2 *B. angulatum*, 7 *B. breve*, 13 *B. animalis* и 5 *B. dentium*. Представители видов *Bifidobacterium pseudolongum*, *B. gallicum* и *B. kashiwanohense* обнаружены не были. Таким образом, самым распространенным из видов был *B. longum* (обнаруживался в 65 случаях из 93 — 70,0%), а самыми редкими — виды *B. dentium* (5 случаев из 93 — 5,4%) и *B. angulatum* (2 случая из 93 — 2,2%). Послед-

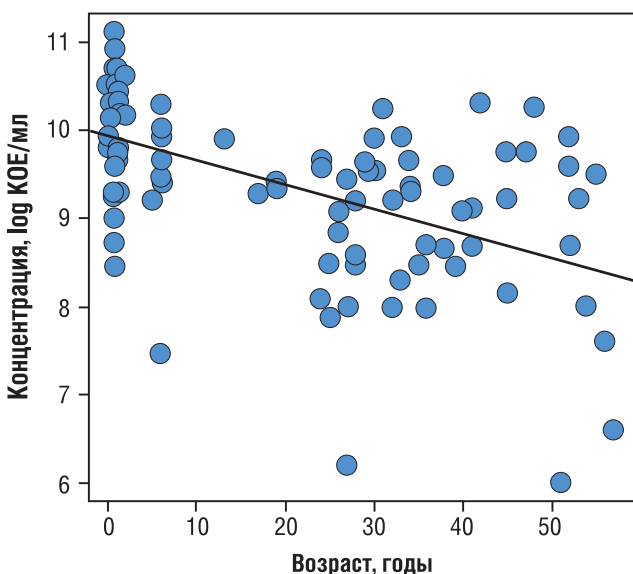


Рис. 1. Зависимость тотальной концентрации бифидобактерий от возраста обследуемого.

Примечание. Каждая точка соответствует одному обследуемому. Линия тренда построена с использованием метода наименьших квадратов в координатах, представленных на графике.

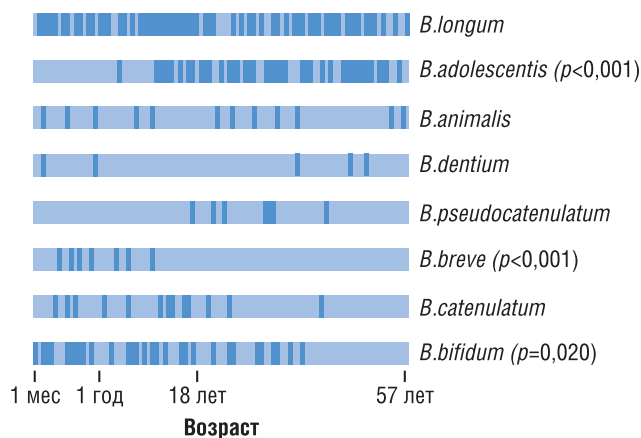


Рис. 2. Встречаемость видов бифидобактерий в зависимости от возраста обследуемого.

Примечание. Диаграммы разделены на 93 столбца, каждый из которых соответствует одному обследуемому; расположены в порядке от наименьшего возраста к наибольшему. Черный цвет означает наличие данного вида среди штаммов, выделенных от данного пациента, серый — отсутствие. Для видов, встречаемость которых значимо зависит от возраста, указаны соответствующие значения p. Вид *B. angulatum*, представленный в данном исследовании всего 2 штаммами, был исключен из анализа.

ний был исключен из анализа встречаемости вследствие крайне малой представленности. Необходимо отметить, что для *B. longum* в данном исследовании не разделялись внутривидовые группы.

Суммарная концентрация бифидобактерий у обследуемых в среднем составила $9,3 \pm 1,0 \log \text{ КОЕ/г}$ (рис. 1); средние концентрации отдельных видов незначимо варьировали от 8,5 до 9,7 $\log \text{ КОЕ/г}$. С использованием регрессионного анализа было показано, что суммарная концентрация бифидобактерий в среднем снижается с возрастом ($p < 0,001$). Также снижение концентрации было выявлено для отдельных видов: *B. longum* ($p < 0,001$), *B. catenulatum* ($p = 0,014$) и *B. animalis* ($p = 0,036$). Ни для одного из видов бифидобактерий не было установлено статистически значимого повышения их абсолютной концентрации с возрастом.

Для некоторых видов показано, что их встречаемость (в концентрации более 10^6 КОЕ/г , служившей порогом чувствительности в данном исследовании) зависит от возраста (рис. 2). В частности, было обнаружено статистически значимое снижение частоты встречаемости *B. breve* с возрастом ($p < 0,001$), максимальный возраст их носителя в данном исследовании составил 2 года. Также с возрастом уменьшалась частота обнаружения *B. bifidum* ($p = 0,020$). Напротив, встречаемость *B. adolescentis* с возрастом увеличивалась ($p < 0,001$). В данной выборке они обнаруживались только среди обследуемых не младше 12 мес. Для остальных видов не установлено значимой зависимости частоты их выделения от возраста.

Обсуждение

По результатам исследования показано значимое уменьшение частоты встречаемости видов *B. bifidum* и *B. breve* с возрастом и повышение частоты встречаемости вида *B. adolescentis*. Также отмечено статистически значимое снижение как тотальной концентрации бифидобактерий, так и в отдельности видов *B. longum*, *B. catenulatum* и *B. animalis*. В исследовании не были обнаружены

ранее выделенные из микрофлоры кишечника человека *B. pseudolongum*, *B. gallicum* и *B. kashiwanohense*. Вероятно, это связано с их относительно редкой встречаемостью в микрофлоре кишечника человека, в соответствии с данными, полученными некультуральными методами [8].

Микробиоценоз толстого кишечника человека является системой, взаимодействия внутри которой чрезвычайно сложны и все еще далеки от полного понимания. Это обусловлено и большим числом формирующих ее микроорганизмов, и значительными ее различиями между индивидуумами, и высоким уровнем внутривидовой изменчивости бактерий в ее составе. В последние годы с появлением технологий высокопроизводительного секвенирования и внедрением MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации чистых культур микроорганизмов открылись новые возможности для детального изучения различных аспектов нормальной микрофлоры.

В недавних исследованиях показано, что микрофлора человека отличается значительной стабильностью на уровне видов и внутривидовых групп, в т.ч. это относится к самым изученным микроорганизмам среди численно доминирующих представителей микрофлоры — бифидобактериям [19, 20]. При этом в ней ярко прослеживаются плавные изменения в процессе взросления. Причины этого, а также роль данных изменений не являются очевидными. Частично происходящая смена видового состава может быть объяснена изменением спектра доступных для утилизации субстратов в кишечнике при переходе от вскармливания материнским молоком или искусственными смесями к взрослому типу питания. Так, вид *B. adolescentis*, встречаемость которого увеличивается по мере взросления, по-видимому, специализируется на сбраживании растительных углеводов, в частности крахмала [21]. Представители вида *B. bifidum*, встречаемость которых уменьшается с возрастом, обладают набором сиалидаз и фукозидаз, обеспечивающих утилизацию как муцина толстой кишки, так и олигосахаридов грудного молока [22]. Для вида *B. longum*, обладающего значительным генетическим разнообразием, показано уменьшение с возрастом встречаемости подвида *infantis*, способного сбраживать молочные олигосахариды, при сохранении численности подвида *longum*, более приспособленного для метаболизма растительных ксилозо- и арабинозосодержащих углеводов [23].

Однако очевидные изменения в рационе питания человека при его взрослении не объясняют быстрое исчезновение вида *B. breve*, обладающего широким спектром гликолитических ферментов для расщепления циклодекстринов и галактанов [24]. Вероятно, в адаптации системы микроорганизм–хозяин большее значение имеют метаболическое взаимодействие между различными микроорганизмами кишечной микрофлоры на уровне взаимодополнения ферментного набора для расщепления различных субстратов, а также использование одними бактериями продуктов жизнедеятельности других [25]. В этом случае бактериальная популяция изменяется как целое, адаптируясь к соответствующим

изменениям своей экологической ниши в ходе взросления человека. Свой вклад в этот процесс также может вносить постепенное повышение с возрастом видовой разнообразия микроорганизмов нормальной микрофлоры из-за постоянных контактов с новыми штаммами бактерий, потенциально способных к колонизации толстой кишки [11].

До настоящего времени остается неизученным влияние смены микрофлоры на физиологические процессы в организме. Можно предположить, что постепенное нарастание видовой и штаммового разнообразия приводит к функциональной избыточности метаболических процессов в микрофлоре, что повышает ее стабильность под действием различных внешних факторов, поскольку снижение функциональной активности ранее доминировавших групп может быть компенсировано другими членами сообщества. В то же время остается неясной роль снижения представленности отдельных видов, характерных только для детского возраста, таких как *B. breve*. Кроме того, малоизучен вклад внутривидовой генетической изменчивости бифидобактерий во взаимоотношения микроорганизм–хозяин. Можно надеяться, что дальнейшие исследования в области анализа взаимодействий, происходящих в нормальной микрофлоре, помогут решить данные вопросы.

439

Ограничения исследования

Основным ограничением исследования является анализ только видов бифидобактерий, концентрация которых превышала 10^6 КОЕ/г, вследствие использования разведений исследуемого материала при посеве на плотные питательные среды. Также не может быть исключено присутствие в образцах видов бифидобактерий, которые не растут на питательной среде, использованной в данном исследовании.

Заключение

Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии показал возможность быстрой, дешевой и надежной идентификации бифидобактерий, выделяемых из микрофлоры кишечника. Это позволило провести сравнительное исследование бифидобактерий толстого кишечника в процессе становления микрофлоры, показавшее постепенную смену микробного пейзажа в ходе взросления человека. Установлено значимое уменьшение частоты встречаемости видов *B. bifidum* и *B. breve* с возрастом и увеличение встречаемости вида *B. adolescentis*. Общая концентрация бифидобактерий в кишечнике снижается, отражая общую перестройку микробного сообщества.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006; 7 (7): 688–693.
2. Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyuru H., Sasikala M., Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(29): 8787–8803
3. Rossi M., Amaretti A., Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients.* 2011; 3 (1): 118–134.
4. Vieira A.T., Teixeira M.M., Martins F.S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol.* 2013; 4: 445.

5. Francino M.P. Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathog.* 2014; 3 (3): 769–790.
6. Luna R.A., Foster J.A. Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015; 32: 35–41.
7. Foster J.A., McVey Neufeld K.A. Gut brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 2013; 36 (5): 305–312.
8. Turrone F., Peano C., Pass D.A., Foroni E., Severgnini M., Claesson M.J., Kerr C., Ventura M. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One.* 2012; 7 (5): 36957.
9. Jakobsson H.E., Abrahamsson T.R., Jenmalm M.C., Harris K., Quince C., Jernberg C. Björkstén B. Engstrand L., Andersson A.F. Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut.* 2014; 63 (4): 559–566.
10. Fan W., Huo G., Li X., Yang L., Duan C., Wang T., Chen J. Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 29 (12): 2365–2372. Doi: 10.1007/s11274-013-1404-3.
11. Ringel-Kulka T., Cheng J., Ringel Y., Salojarvi J., Carroll I., Palva A., de Vos W.M., Satokari R. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults a high throughput microarray analysis. *PLoS One.* 2013; 8 (5): 64315.
12. Mayo V., van Sinderen D. Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects. *Norfolk, UK: Caister Academic Press.* 2010. 260 p.
13. Шкопоров А.Н., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Смянов В.В., Кириллов М.Ю., Постникова Е.А., Максимов Ф.Е., Хохлова Е.В., Ефимов Б.А. Молекулярно-генетический анализ видового и штаммового разнообразия бифидобактерий у детей раннего возраста. *Вестник РАМН.* 2006; 1: 45–50.
14. Turrone F., Foroni E., Pizzetti P., Giubellini V., Ribbera A., Merusi P., Cagnasso P., Bizzari B., de'Angelis G.L., Shanahan F., van Sinderen D., Ventura M. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl. Environ Microbiol.* 2009; 75 (6): 1534–1545.
15. Ignys I., Szachta P., Galecka M., Schmidt M., Pazgrat-Patan M. Methods of analysis of gut microorganism — actual state of knowledge. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2014; 21 (4): 799–803.
16. Bahaka D., Neut C., Khattabi A., Monget D., Gavini F. Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1993; 43 (3): 565–573.
17. Nomura F. Proteome based bacterial identification using matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDITOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochem Biophys Acta.* 2015; 1854 (6): 528–537.
18. Willson V.L. Critical Values of the Rank-Biserial Correlation Coefficient. *Edu. Psychol. Meas.* 1976; 36 (2): 297–300.
19. Faith J.J., Guruge J.L., Charbonneau M., Subramanian S., Seedorf H., Goodman A.L., Clemente J.C., Knight R., Heath A.C., Leibel R.L., Rosenbaum M., Gordon J.I. The long term stability of the human gut microbiota. *Science.* 2013; 341 (6141): 1237439.
20. Shkoporov A.N., Efimov B.A., Khokhlova E.V., Chaplin A.V., Kafarskaya L.I., Durkin A.S., McCorrison J., Torralba M. Draft Genome Sequences of Two Pairs of Human Intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Strains, 44B and 16B and 35B and 22B, Consecutively Isolated from Two Children after a 5 Year Time Period. *Genome Announc.* 2013; 1 (3): e00234–13.
21. Duranti S., Turrone F., Lugli G.A., Milani C., Viappiani A., Mangifesta M., Mancabelli L., Sanchez B., Ferrario C., Mancino W., Gueimonde M. Genomic characterization and transcriptional studies of the starch utilizing strain *Bifidobacterium adolescentis* 22L. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80 (19): 6080–6090.
22. Turrone F., Duranti S., Bottacini F., Guglielmetti S., Van Sinderen D., Ventura M. *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Front Microbiol.* 2014; 5: 437.
23. Lee J.H., O'Sullivan D.J. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74 (3): 378–416.
24. Pokusaeva K., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.* 2011; 6 (3): 285–306.
25. Rios-Covian D., Arbolea S., Hernandez-Barranco A.M., Alvarez-Buylla J.R., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C.G. Interactions between *Bifidobacterium* and *Bacteroides* species in cofermentations are affected by carbon sources, including exopolysaccharides produced by bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79 (23): 7518–7524.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Чаплин Андрей Викторович, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: okolomedik@gmail.com

Бржозовский Александр Геннадьевич, лаборант-исследователь РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: barjik@mail.ru

Парфёнова Татьяна Витальевна, лаборант-исследователь, младший научный сотрудник НИИ ФХМ
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, тел.: +7 (499) 245-04-71, e-mail: parfenova1983@gmail.com

Кафарская Людмила Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: likmed@mail.ru

Володин Николай Николаевич, доктор медицинских наук, академик РАМН, профессор ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, тел.: +7 (495) 287-65-70, e-mail: info@fnkc.ru

Шкопоров Андрей Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: a.shkoporov@gmail.com

Ильина Елена Николаевна, доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов НИИ ФХМ
Адрес: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, тел.: +7 (499) 245-04-71, e-mail: iliinaen@gmail.com

Ефимов Борис Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: efimov_ba@mail.ru