

Ю.П. Джиоев, Е.Б. Ракова, С.М. Попкова, А.Г. Леонтьева, Е.А. Петрова, Т.В. Демина,
И.Ю. Сафронова, Е.А. Кунгурцева

ГЕНОВИДОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗНООБРАЗИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ У НАСЕЛЕНИЯ г.г. ИРКУТСК И АНГАРСК

Институт эпидемиологии и микробиологии ГУ НЦМЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

Впервые методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) с набором видоспецифичных синтетических олигонуклеотидов определен геновидовой спектр бифидобактерий у населения г.г. Иркутск и Ангарск. Использовано было четыре видоспецифичных олигонуклеотида к видам бифидобактерий: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*. Все эти четыре вида бифидобактерий присутствуют в популяциях населения обоих городов. Выявлена рейтинговая структура геновидов бифидобактерий в популяциях населения этих городов. В обоих городах доминантным видом является *B. longum*, но в г. Иркутск субдоминантами являются также *B. catenulatum* и *B. bifidum*, в то время как в Ангарске субдоминантная структура представлена в основном *B. bifidum*.

Ключевые слова: бифидобактерии, молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот, олигонуклеотидные зонды

GENOSPECIFIC CHARACTERISTIC OF A VARIETY BIFIDOBACTERIA IN POPULATION OF IRKUTSK AND ANGARSK

Yu.P. Dzhioev, E.B. Rakova, S.M. Popkova, A.G. Leontieva, E.A. Petrova, T.V. Demina,
I.U. Saphronova, E.A. Kungurtseva

Institute of Epidemiology and Microbiology SCME ESSC SD RAMS, Irkutsk

The use of the method molecular hybridization of nucleic acids (MHNA) with species-specific synthetic oligonucleotide probes kit was pioneered to determine bifidobacteria genospecific repertoire in population of Irkutsk and Angarsk towns. Four species-specific oligonucleotide probes for the bifidobacteria species, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, were used. All these four bifidobacteria species were found in population of the both towns. Bifidobacteria genospecific rating structure was detected in population these towns. *B. longum* was dominated in the both towns, but *B. bifidum* and *B. catenulatum* were the subdominant species in Irkutsk, while in Angarsk subdominant structure was presented mainly by *B. bifidum*.

Key words: bifidobacteria, molecular hybridization of nucleic acids, oligonucleotide probes

Экологическая система, неразрывными компонентами которой являются макроорганизм, его микрофлора и окружающая среда, характеризуется единством и способностью к саморегуляции. В результате различных неблагоприятных воздействий и патологических состояний могут происходить качественные и количественные изменения в составе нормальной микрофлоры кишечника [13]. Микроорганизмы желудочно-кишечного тракта обеспечивают процессы переваривания и всасывания, трофику кишечника, антиинфекционную защиту, синтез витаминов и т.д. Самыми многочисленными и наиболее хорошо изученными являются микроорганизмы толстой кишки, насчитывающие около 10^{12} КОЕ/мл, где преобладают бактерии рода *Bifidobacterium* [1].

Бифидобактерии — грамположительные, анаэробные, неспорообразующие бактерии, являются естественными обитателями желудочно-кишечного тракта человека и животных [8, 11]. Роль бифидофлоры в поддержании гомеостаза человеческого организма неоспорима. Это связано с широким спектром функций, выполняемых бифидобактериями в кишечнике, в том числе защита от экспансии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Но, как показывают исследования микробного пейзажа толстого кишечника, в ряде случаев ус-

ловно-патогенная микрофлора регистрируется при высоком титре содержания бифидобактерий в кишечнике. Бифидобактерии — интересная в систематическом аспекте группа микроорганизмов, имеющая и важное практическое значение.

В настоящее время идентификация видов бифидобактерий, осуществляемая традиционными культуральными методами, трудоемка, требует достаточных материальных затрат, так как основана на фенотипических характеристиках бактерий, что ограничивает возможности проведения качественного и количественного исследования популяций бифидобактерий, выделенных из кишечного биоценоза. Более совершенные современные технологии по систематике и диагностике бактериальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека основаны на анализе генетических структур бактерий (ДНК, РНК), которые позволяют достаточно качественно и количественно оценить видовое разнообразие сообществ микроорганизмов, присутствующих индивидууму, с помощью генотипирования [14–16].

Цель — с помощью метода генотипирования изучить спектр и рейтинг видов бифидобактерий у лиц городского населения с различной степенью нарушения микробиоценоза толстого кишечника.

В задачи данного исследования входили:

1. Технологическая адаптация метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) к структурным и генетическим особенностям бифидобактерий, выращенных на оптимизированной культуральной среде.

2. Определение спектра генетического разнообразия видов рода *Bifidobacterium* в кишечнике детей и взрослых, проживающих в зоне массивного техногенного загрязнения, а также выявление доминирующих видов бифидобактерий в популяционной выборке людей с нарушением микробиоценоза кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая выборка из двух городов Иркутской области составила 75 человек, причем из г. Иркутск — 40 человек, из г. Ангарск — 35 человек. Эти города относятся к экологически неблагоприятным территориям с высокой степенью техногенного загрязнения [3]. Выборка из Иркутска состояла из 37 детей и 3 взрослых, из Ангарска — 15 пар «мать — ребенок» и отдельно из 2 взрослых и 3 детей. При изучении микробной экологии кишечника использовались данные микробиологического исследования образцов фекалий. Забор материала, посеvy, идентификация микроорганизмов осуществлялись по стандартным классическим методикам [4, 6 — 8, 12].

В основу определения вида бифидобактерий был положен метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) с набором синтетических олигонуклеотидных зондов, специфически комплементарных видам: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*. Этот метод состоит из нескольких последовательных этапов. МГНК является одним из современных методов детекции и типирования генетического материала в образцах различной природы и достаточно хорошо разработан и доступен для лабораторной диагностики [9].

На первом этапе суммарную бактериальную ДНК из культуральной тиогликолевой среды выделяли, используя метод А.С. Хантера [2] применительно к грамположительным бактериям с некоторыми собственными модификациями. Центрифугировали 10 мл выращенной ночной культуры бифидобактерий 10 мин. — 3–4 тыс. об./мин. Сливали надосадочную культуральную среду, к осадкам клеток добавляли 2 мл буфера ТЭ рН 8,0, перемещали тщательно до полного суспендирования. Отбирали 1 мл суспензии клеток в пробирку Эппендорфа (1,5 мл), ц/ф 3 мин. Сливали надосадочную жидкость, осадок суспендировали в 0,5 мл буфера ТЭ рН 8,0. Добавляли лизоцима (1 мг/мл) и инкубировали при 30 °С 15 мин. Вносили 40 мкл 10% раствора SDS (додецилсульфата натрия), перемещали. Добавляли 550 мкл фенола, насыщенного Трис-HCL, рН 8,0, перемещали и вносили 30 мкл 5 М NaCl, перемешивали 5 мин. Центрифугировали 7 мин. — 12 тыс. об./мин., отбирали верхнюю водную фазу (супернатант) в новую пробирку. Добавили равный объем смеси хло-

роформ — изоамиловый спирт (24 : 1), перемешали и ц/ф 3 мин. — 12 тыс. об./мин. Отбрали супернатант в новую пробирку и внесли не менее 2-х объемов перегнанного этанола. Осторожно перемешивали и оставляли на 1 час при — 20 °С (или на ночь). Ц/ф 10 мин. — 12 тыс. об./мин. Спирт сливали, осадки сушили при комнатной температуре около 30 мин. Осадки суспендировали в 100 мкл буфера ТЭ рН 8,0 и в таком виде их можно хранить при — 20 °С.

На втором этапе определяли оптическую плотность бактериальной ДНК в растворе, используя спектрофотометр. После определения концентрации ДНК бифидобактерий отбирали аликвоту с 2–3 мкг ДНК, денатурировали в буфере — 50 мМ фосфатный буфер, рН 7,0 и 7,5 % формальдегид и инкубировали в течение 15 мин. при 55 °С. Пробы сразу охлаждали в ледяной воде и сюда же вносили равный объем 5 М NaCl. Далее пробы, используя прибор — дотер, в виде пятен наносились на нитроцеллюлозные или капроновые фильтры. ДНК иммобилизовали на поверхности фильтров посредством отжига в вакууме при 80 °С в течение 2 часов (нитроцеллюлозный фильтр) или 5 мин. под УФ-излучением (капроновый фильтр).

Третий этап включал мечение используемых деоксиолигонуклеотидных зондов (длиной 20 нуклеотидов) радиоактивным изотопом фосфора ³² (гамма) стандартным методом, по Маниатису (Маниатис). Процент включения радиоактивной метки в олигонуклеотид считался достаточным тогда, когда она превышала 30 %. Далее проводили процесс гибридизации меченых олигонуклеотидов с комплементарной иммобилизованной на фильтрах ДНК. Но перед этим необходимо эти фильтры инкубировать в предгибризационном буфере в течение 1–2 часов при 65 °С для забивания пространства вокруг точек образцов, чтобы исключить неспецифическое связывание меченых олигонуклеотидов с поверхностью фильтра. После предгибризации в этот же буфер вносили соответствующий меченый олигонуклеотид и проводили гибридизацию при 47 °С в течение ночи (12–16 часов). Далее отмывали несвязавшиеся меченые олигонуклеотиды с фильтров и проводили экспозицию под рентгеновской пленкой в течение 12–36 часов при — 75 °С. Проявление и фиксаж рентгеновских пленок проводили в стандартных условиях. Для анализа результатов гибридизации использовали контроли: положительной (референс штаммы бифидобактерий — *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*), отрицательной — денатурированное ДНК быка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее часто в биоценотической картине бифидобактерий у людей различных возрастных групп типично встречаются виды — *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum* [8]. Гибридизационный тест со всеми олигонуклеотидами данных видов провели с 75 образцами ДНК, выделенных из клеточной биомассы, выращенной на тиогликолевой сре-

де из разведений фекалий от людей с разной степенью микробиологического дисбаланса кишечного биоценоза. Популяционные выборки населения г.г. Иркутск и Ангарск представлены в разновозрастном аспекте и в большей мере брались для характеристики видового разнообразия бифидобактерий, без анализа меж- и внутригрупповых профессиональных и возрастных аспектов. Каждая проба культивировалась в трех разведениях: 10^6 , 10^8 , 10^9 , чтобы в последнем разведении были представлены только бифидобактерии. В первом разведении в культуральном бульоне присутствовали также лактобациллы. Соответственно, на фильтры были нанесены все три разведения. Это дает дополнительную информацию о количественном и качественном присутствии бифидобактерий в данной среде и соответственно косвенно характеризует эти показатели в организме индивидуума.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, представители рода *Bifidobacterium* в разной количественной и качественной степени представлены в ЖКТ как у здоровых, так и у больных с дисбиозами. Определение этих показателей по бифидобактериям у людей является очень важной характеристикой состояния здоровья человека, живущего в экологически неблагоприятных условиях, особенно в городах, где высока степень техногенного загрязнения. Цель и задачи, поставленные в данной работе, были сформулированы для получения первичной информации о видовой и доминантной структуре бифидобактерий у городского населения промышленных городов, чтобы оценить степень их сравнительного разнообразия и представительства и сформировать дальнейшую исследовательскую стратегию. Полученная информация видового и доминантного разнообразия бифидобактерий послужит отправной точкой для изучения корреляционных взаимоотношений этих характеристик с особенностями организма определенного индивидуума и средой проживания.

В гибридационной картине по всей выборке были определены все четыре вида бифидобактерий, но с различной степенью представительства. На рисунке 1 представлена рентгенограмма гибридационной картины ДНК бифидобактерий из популяционной выборки г. Ангарск. Как видим, все четыре вида бифидобактерий присутствуют в группе населения. Рейтинг встречаемости видов бифидобактерий представлен в следующей последовательности: *B. longum*, *B. bifidum*, *B. catenulatum* и *B. adolescentis*. При сравнении по количеству гибридационных сигналов на рентгеновской пленке в рейтинговой последовательности получаем следующие показатели: 70 : 18 : 9 : 8. Отношение показателя доминантного вида к субдоминантному (*B. bifidum*) равно 3,9, а к минорным соответственно — 7,8 и 8,8. Такая структура количественных и качественных соотношений видов бифидобактерий в популяционной выборке из г. Ангарск свидетельствует, возможно, о наложе-

нии на результат присутствия почти равного количества взрослых и особенностей экологической среды этого города, что требует отдельного исследования.

На рисунке 2 представлена рентгенограмма результатов гибридационных тестов с популяционной выборкой населения г. Иркутск с тем же набором видоспецифичных олигонуклеотидных зондов, что и в выборке из г. Ангарск. Здесь тоже присутствуют все четыре вида бифидобактерий, но уже в меньших количественных соотношениях. Для г. Иркутск характерна следующая картина видового рейтинга: *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*.

По количественным показателям видовое присутствие, в соответствии с рейтинговой структурой бифидобактерий, определяется следующим соотношением: 50 : 22 : 17 : 10. Как видим, здесь уровень количественных различий между видами ниже и это выражается в следующих соотношениях доминантного вида (*B. longum*) ко всем остальным видам бифидобактерий, в соответствии с их расположением в рейтинговой шкале: 2,3, 2,9, 5,0. Возможно, на эти показатели накладывается более однородная возра-

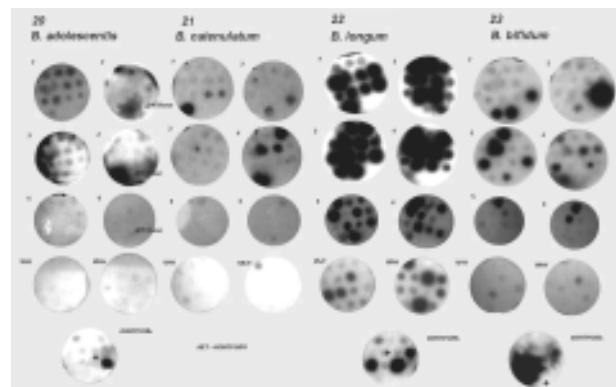


Рис. 1. Рентгенограмма, отображающая результаты гибридационных тестов с видоспецифичными зондами и показывающая наличие или отсутствие отдельных видов бифидобактерий в образцах от жителей г. Ангарска.

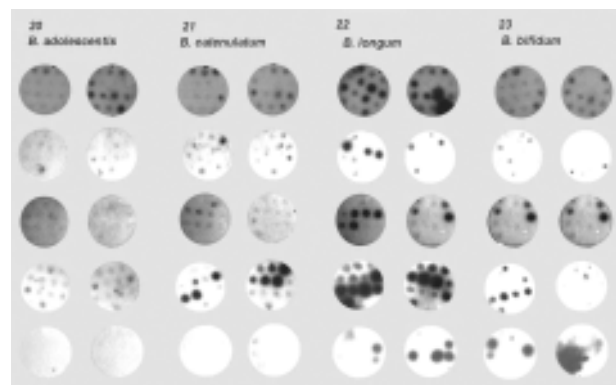


Рис. 2. Рентгеновские пленки, отображающие результаты гибридационных тестов с видоспецифичными зондами и показывающие наличие или отсутствие отдельных видов бифидобактерий в образцах от жителей г. Иркутска.

стная структура выборки, в которой более 90 % представлены детьми.

Таким образом, представленный подход МГНК, адаптированный к особенностям культивирования бифидобактерий, является достаточно информативным для изучения видового количественного и качественного состава бифидобактерий в кишечнике, как при нормальном соотношении микрофлоры, так и с различной степенью дисбиотических нарушений. Показана возможность выявления различий (даже на таких небольших выборках) как по возрастным характеристикам, так и по количественным и качественным соотношениям рейтингового разнообразия видов бифидобактерий. Возможное влияние различий экологических условий проживания людей в этих городах также влияет на эти показатели, что служит еще одним критерием для видового типирования бифидобактерий. Нам представляется, что такой подход по изучению особенностей видового разнообразия бифидобактерий в кишечном биоценозе у лиц разного возраста в городах с различной экологической средой является основой для обоснованного лечения и коррекции дисбактериозов с учетом индивидуальных микрoэкологических характеристик организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельмер С.В. Антибиотик-ассоциированный дисбактериоз кишечника. // <http://www.disbak.ru/php/content.php.group>.
2. Гловер Д. Клонирование ДНК / Д. Гловер. — М.: Мир, 1988. — 538 с.
3. Государственный доклад о состоянии окружающей природной среды Иркутской области в 1997—2000 гг. — Иркутск, 1998—2000.
4. Дисбактериоз кишечника у детей, микрoэкологические подходы к его коррекции: Учебно-метод. пособие. — СПб., 1997. — С. 19.
5. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Френч, Дж. Сэмбрук. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
6. Методические рекомендации по микрoбиологической диагностике дисбактериозов кишечника в лечебно-диагностических учреждениях армии и флота. — СПб.: СПбНИИ эпидемиологии и микрoбиологии имени Пастера, 1999. — 36 с.
7. Методические указания по применению унифицированных микрoбиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях: Приложение 1 к приказу Минздрава СССР № 535. — М., 1986. — С. 18.
8. Микрoбиологическая диагностика дисбактериозов: Метод. рекомендации. — Киев, 1986. — 27 с.
9. Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот как метод быстрой диагностики клещевого энцефалита / Информационно-методическое письмо. — Омск, 1992. — 27 с.
10. Новик Г.И. Исследование биохимических особенностей бифидобактерий на поздних стадиях развития популяций / Г.И. Новик, Н.И. Астапович, А.А. Самарцев // Микрoбиология, 2001. — Т. 70, № 4. — С. 495—502.
11. Определитель бактерий Берджи. — М.: Мир, 1997. — Т. 1. — С. 538, 574.
12. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника. Информационное письмо. — СПб., 2002.
13. Хавкин А.И. Эволюция представлений о роли кишечной микрофлоры // <http://www.disbak.ru/php/content.php?group=442>
14. Ventura M. Identification and traicing of Bifidobacterium srecies by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences / M. Ventura, V. Meylan, R. Zink // *Appl. and Enviromental microbiology*. — 2003. — P. 4296—4301.
15. Molecular microbial analysis of bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ADRA) / M. Ventura, M. Elli, R. Reniero, R. Zink // *FEMS Microbiology Ecology*. — 2001. — Vol. 36. — P. 113—121.
16. Sghir A. Molecular diversity and phylogeny of human colonic bacteria / A. Sghir, J. Dore, R.J. Mackie // *Molecular Ecology in gastrointestinal system*. — P. 199.