

Е.Б. Ракова, С.М. Попкова, У.М. Немченко, Н.М. Шабанова, Е.В. Бухарова

РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИФИДОБАКТЕРИЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ СИБИРИ

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

Были изучены антагонистические свойства бифидобактерий по отношению к оппортунистическим микроорганизмам *in vitro* и проанализирован механизм снижения их антагонистической активности. Зарегистрирован высокий удельный вес аутоштаммов региональной популяции бифидобактерий с низкой антагонистической активностью к представителям транзиторных оппортунистических микроорганизмов, что способствует снижению колонизационной резистентности и требует разработки методов профилактической корригирующей пробиотической терапии.

Ключевые слова: антагонистическая активность, бифидобактерии

REGIONAL FEATURES OF BIFIDOBACTERIA ANTAGONISTIC ACTIVITY IN INTESTINAL MICROBIOTA OF CHILDREN LIVING IN SIBERIA

E.B. Rakova, S.M. Popkova, U.M. Nemchenko, N.M. Shabanova, E.V. Bukharova

Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

Antagonistic properties of bifidobacteria to opportunistic microorganisms *in vitro* and mechanism of antagonistic activity decreasing were studied and analyzed. Great percentage of bifidobacteria regional population strains with low antagonistic activity to transitional opportunistic microorganisms is registered. It results to colonization resistance decreasing and requires development of the preventive probiotics therapy methods to correct.

Key words: antagonistic activity, bifidobacteria

Ни один метаболический процесс, ни одна физиологическая функция в организме не протекает без прямого или опосредованного участия симбиотной микробиоты, и начальной точкой дисбиотических состояний кишечника является подавление индигенного анаэробного микробного компонента, прежде всего, бифидобактерий и лактобацилл, которые в норме оказывают сдерживающее влияние на размер популяций эндогенных условно-патогенных микроорганизмов, и в значительной степени ответственны за поддержание резистентности кишечника к колонизации экзогенными патогенными микроорганизмами, т.н. «колонизационной резистентности» (КР) [7]. Формирование и поддержание (КР) — одна из ключевых функций индигенных микроорганизмов ЖКТ. А основной характеристикой микроорганизмов в системе КР является антагонистическая активность. Механизм антагонистической активности основан на продукции бактериями ингибиторных факторов (короткоцепочечные жирные кислоты, бактериоцины, дефенсины и др.), нарушающих метаболизм патогенных и условно-патогенных бактерий, конкурентной борьбе за питательные субстраты, места адгезии, прямой дегградации токсинов, антиэндотоксическом действии, препятствии транслокации и другие участки организма [11, 13]. Исследования антагонистической активности бифидобактерий и лактобацилл *in vivo* и *in vitro* позволяют проанализировать отдельные звенья формирования колонизационной резистентности [12], что особенно актуально для оценки функционального состояния интестинальной микробиоты.

Целью данного исследования явилось изучение антагонистической активности региональной популяции бифидобактерий.

МЕТОДИКА

В работе были использованы:

1. Микроорганизмы

• Эталонные штаммы бифидобактерий следующих видов: *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239, *Bifidobacterium longum* DSM 20219^T, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры человека ГКНМ ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, аутоштаммы бифидобактерий, выделенные из фекалий детей, проживающих в г.г. Иркутске и Ангарске — 192 штамма, музейный штамм *Escherichia coli* (ЭПК-028/57), эталонный штамм *Staphylococcus aureus* 209 и аутоштаммы *S. aureus*, изолированные из кишечника детей раннего возраста.

2. Образцы фекалий и отделяемое из носоглотки детей, проживающих в г. Ангарске, Шелехове, Иркутске в количестве 169 образцов. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288).

Бактериологическое исследование качественного и количественного состава содержимого кишечника проводили по стандартной методике с использованием актуальных справочных материалов [3, 4, 10]. Идентификацию выделенных культур проводили по общепринятым схемам идентифика-

ции с применением коммерческих тест-систем для биохимической идентификации: СИБ, НИИЭМ, г. Н. Новгород; PLIVA Lachema, Чехия. Инкубация посевов на плотных средах для выделения лакто- и бифидобактерий осуществлялась в микроанэростате с использованием газогенерирующих пакетов «Анаэрогаз». Плотность популяции микроорганизмов в образцах определялась в lg колониеобразующих единиц на грамм (lg КОЕ/г).

Антагонистическая активность аутоштаммов бифидобактерий определялась методом отсроченного антагонизма (метод штрихов) [1, 9].

Для определения и оценки антагонистической активности использовались аутоштаммы и эталонные штаммы бифидобактерий. В качестве антагонистической «мишени» использовались эталонные штаммы условно-патогенных микроорганизмов: *S. aureus* 209 и энтеропатогенная кишечная палочка (ЭПК-028/57), аутоштаммы *S. aureus*, выделенные от детей.

Статистическая обработка данных произведена при помощи лицензионных прикладных программ «MS Excel for Windows» и «Statgrafics». Вычислялись основные показатели параметрических методов вариационной статистики (средняя арифметическая, мода, медиана, дисперсия, критерий Стьюдента-Фишера, достоверность полученных результатов), а также непараметрические критерии оценки достоверности (критерий Вилкоксона) при критическом значении уровня значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование микробиоты толстого кишечника детей показало, что при дефиците аутохтонных анаэробов (бифидобактерий и лактобацилл), который был выявлен в $50,8 \pm 1,9$ % обследованных детей, условно-патогенные микроорганизмы выделялись в диагностически значимых количе-

ствах. Так, было установлено, что при нормальном количественном (физиологическом) содержании в кишечнике бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} > 9$) *S. aureus* регистрировался в 32 % случаев, при дефиците бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} < 9$) наличие *S. aureus* в диагностически значимых количествах регистрировалось в 68 % (рис. 1).

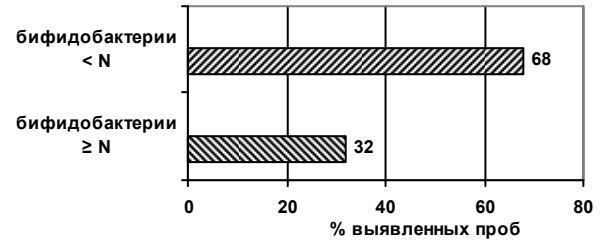


Рис. 1. Выявление *S. aureus* в зависимости от содержания бифидобактерий. Примечание: $\geq N$ – нормативное содержание бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} > 9$); $< N$ – дефицит бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} < 9$).

Следует подчеркнуть, что понятие «диагностически значимые количества» трактуется неоднозначно. Многие исследователи по-прежнему считают диагностически значимой концентрацией условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) величину $\lg \text{КОЕ/г} > 5$. В то же время в отечественной и зарубежной литературе все чаще признается возможность развития инфекционного процесса, спровоцированного оппортунистическими микроорганизмами, при их концентрации $10^2 - 10^3 \text{КОЕ/г}$. Это связывают со снижением общей резистентности организма человека в условиях неблагоприятной экологической обстановки [8].

Полученные данные о взаимосвязи количественного содержания в кишечнике бифидобактерий с индикацией УПМ (*S. aureus*), хотя и подтверждали положение о нормализующем влиянии бифидобактерий на микробиоценоз кишечника,

Таблица 1
Антагонистические свойства контрольных штаммов бифидобактерий к эталонным штаммам УПМ

Эталонные штаммы	<i>Bifidum bifidum</i> DSM 20239		<i>Bifidum longum</i> DSM 20219 ^T	
	МРС-5**	Блаурокка**	МРС-5	Блаурокка
<i>S. aureus</i> 209	9	4	9	10
ЭПК 028***	10	4	9	15

Примечание: * ЗЗР – зона задержки роста в мм; ** – МРС-5 и Блаурокка – среды для культивирования бифидобактерий, согласно инструкции по определению антагонистических свойств; ***ЭПК 028 – энтеропатогенная *E. coli*.

Таблица 2
Характеристика антагонистических свойств аутоштаммов бифидобактерий к УПМ (%)

Тест-культура УПМ	Зона задержки роста (мм)			
	0	0–5	5–10	10 и >
<i>S. aureus</i> 209	$8,8 \pm 2,0$	$62,6 \pm 3,4$	$20,0 \pm 3,0$	$8,6 \pm 2,1$
ЭПК 028	$6,5 \pm 1,7$	$49,4 \pm 3,6$	$43,4 \pm 3,5$	$0,5 \pm 0,05$
Аутоштамм <i>S. aureus</i>	$9,8 \pm 0,3$	$74,7 \pm 3,1$	$14,2 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,07$

также свидетельствовали о низкой антагонистической активности индигенных микроорганизмов. И кроме зафиксированной нами тенденции выделения из кишечного биоценоза детей представителей условно-патогенных микроорганизмов на фоне низкого содержания естественных антагонистов УПМ, бифидобактерий и лактобацилл, что вполне логично, обращали на себя внимание частые случаи выделения УПМ у детей на фоне оптимальной концентрации бифидобактерий и лактобацилл.

Нами был проведен эксперимент по оценке антагонистической активности аутоштаммов бифидобактерий, выделенных от детей, проживающих в г. Иркутске, по отношению к транзиторному представителю кишечной микробиоты – *S. aureus*. В качестве «антагонистической мишени» были использованы эталонные штаммы *S. aureus* 209 и ЭПКП 028 и три аутоштамма *S. aureus*, выделенные из кишечника детей 5 лет. Для сравнения в таблице 1 приведены показатели антагонистической активности бифидобактерий двух музейных штаммов (*Bifidobacterium bifidum* DSM 20239, *Bifidobacterium longum* DSM 20219^T) с одновременным определением антагонистической активности аутоштаммов. Показатели антагонистической активности контрольных штаммов бифидобактерий значительно превышали таковые у штаммов, выделенных от детей Иркутска (табл. 1, 2).

В проведенном нами эксперименте *in vitro* было показано, что из 192 аутоштаммов бифидобактерий 71,4 ± 3,2 % обладали низкой антагонистической активностью по отношению к эталонному штамму *S. aureus* 209 (зона задержки роста < 5 мм.) (рис. 2). Показательно, что удельный вес бифидобактерий с низкой антагонистической активностью к аутоштаммам *S. aureus* был еще выше и суммарно составил 84,5 ± 2,5 % (табл. 2).

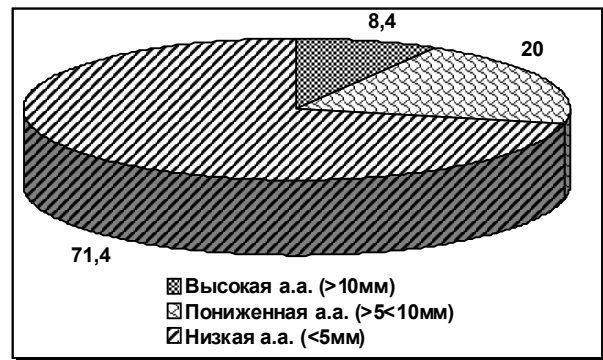


Рис. 2. Антагонистическая активность аутоштаммов бифидобактерий (192 шт.) к *S. aureus*. а.а. – антагонистическая активность.

Изучение плотности УПМ одновременно в двух биотопах (носоглотке и кишечнике) у обследованных детей позволило проанализировать динамику снижения антагонистической активности бифидобактерий на фоне оптимального либо дефицитного содержания лактобацилл (рис. 3).

При одновременном физиологическом содержании как бифидобактерий, так и лактобацилл (верхний левый квадрат рис. 3) УПМ у детей или не обнаруживается (кишечник) или выделяется в малом проценте случаев (6 % случаев – носоглотка).

При дефиците бифидобактерий и норме лактобацилл (верхний правый квадрат, рис. 3) обнаружение УПМ минимально – 6 % случаев, но уже в двух биотопах. Незначительная частота индикации УПМ определяется компенсаторными функциями лактобацилл, принимающими на себя основную нагрузку по обеспечению колонизационной резистентности. Но в то же время процесс выходит за рамки одного биотопа, что подтверждает существование механизма дистантных межмикробных коммуникаций посредством сигнальных молекул и опосредованное

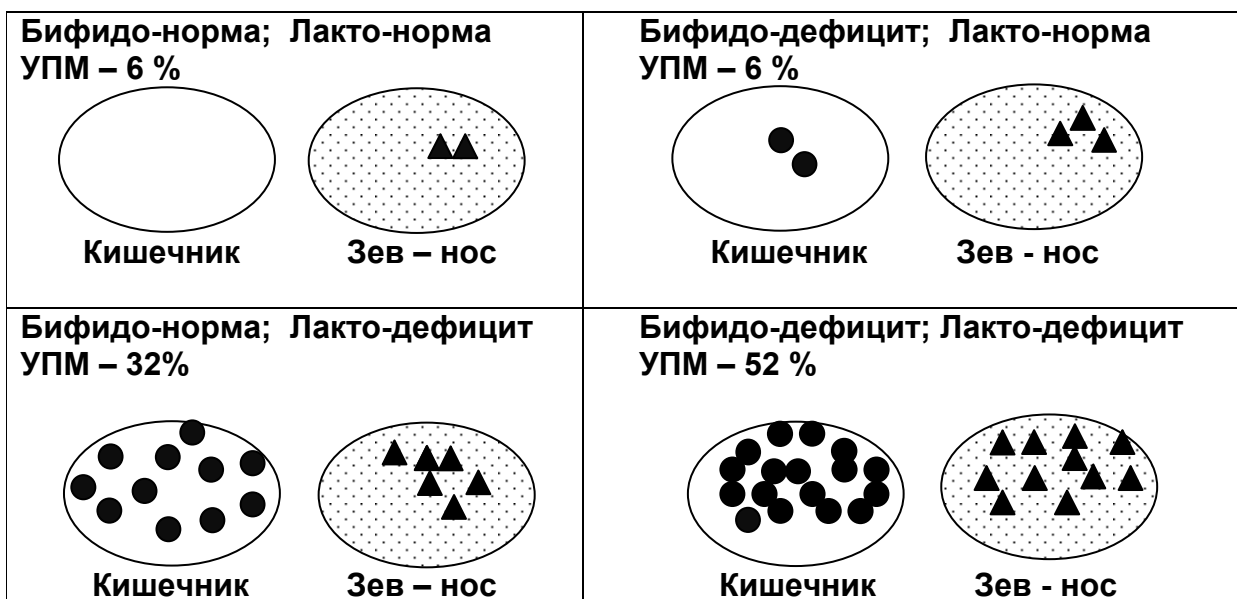


Рис. 3. Оценка антагонистической активности бифидобактерий (*in vivo*). ● – УПМ, выделенная из кишечного биоценоза, ▲ – УПМ, выделенная из носоглотки.

влияние кишечных антагонистов на микроархитектуру других биотопов организма человека [2, 5].

При нормальном содержании бифидобактерий и дефиците лактобацилл (нижний левый квадрат) происходит рост индикации УПМ (32%), по-видимому, за счет снижения антагонистической активности обоих видов (количественной для лактобацилл, либо качественной для бифидобактерий).

При сочетанном дефиците бифидобактерий и лактобацилл происходит пик индикации УПМ: более 50% случаев выделения УПМ. Здесь проявляется описанный многими исследователями феномен плотно зависящего кворум эффекта [5]. Весьма характерно, что по мере снижения суммарной антагонистической активности исследуемых видов бактерий прослеживается общая тенденция роста выделения УПМ одновременно из двух биотопов (носоглотка, кишечник).

Хотя, по мнению некоторых исследователей, результаты взаимодействия микроорганизмов в условиях *in vitro* и *in vivo* могут различаться, полученные данные полностью согласуются. Поэтому есть основания полагать, что низкая антагонистическая активность индигенных микроорганизмов кишечника является особенностью микробной экологии детей, проживающих в экологически неблагоприятных условиях Восточной Сибири.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, зарегистрирован высокий удельный вес аутоштаммов региональной популяции бифидобактерий с низкой антагонистической активностью к представителям транзиторных оппортунистических микроорганизмов, что способствует снижению общей колонизационной резистентности, и, следовательно, приводит к нарушению уровня защиты от экспансии различных патогенов, что требует дальнейшего мониторинга состояния интестинального микробиоценоза у детей и разработки методов профилактической корригирующей пробиотической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. — 2-изд. — СПб.: ИнформМед, 2009. — 276 с.
2. Домарадский И.В., Хохолев Т.Х., Кондракова О.А. Противоречивая микробиология // Рос-

сийский химический журнал. — 2002. — № 46 (3). — С. 80–89.

3. Йоргенсен Дж.Х. Микробиологический справочник для клиницистов. — М: Мир, 2006. — 242 с.

4. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Т. 3. Клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний. / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Лабора, 2009. — С. 71–141.

5. Микробная эндокринология и биополитика / А.В. Олескин [и др.] // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. Биология. — 1998. — № 4. — С. 3–10.

6. Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» / ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ №231 от 09.06.2003. — 70 с.

7. Пинегин Б.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. Дисбактериозы кишечника. — М., 1984. — 144 с.

8. Подволоцкая А.Б. Функциональная характеристика аутомикрофлоры кожи детей младшего школьного возраста в условиях техногенного загрязнения среды : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2000. — 31 с.

9. Постникова Е.А. Изучение биологических свойств бифидо- и лактобактерий, выделенных из кишечника здоровых детей раннего возраста, с целью создания на их основе препарата для лечения дисбиотических нарушений нормальной микрофлоры : автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — М, 2003. — 24 с.

10. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника // Информационное письмо. СПб. — 2002. — 15 с.

11. Human Microbiota-Secreted Factors Inhibit Shiga Toxin Synthesis by Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 / T. de Sablet [et al.] // Infect. Immun. — 2009. — Vol. 77. — P. 783–790.

12. Servin A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens // FEMS Microbiol. Rev. — 2004. — Vol. 28, N 4. — P. 405–440.

13. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., de Vos W.M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota // Gut. — 2008. — N 57. — P. 1605–1615.

Сведения об авторах

Ракова Елена Борисовна — к.б.н., научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел. 8(3952) 33-34-41; e-mail: lenova@mail.ru)

Попкова София Марковна — д.б.н., руководитель лаборатории микробиологии, ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел. 8(3952) 33-34-41; e-mail: smpopkova@gmail.com)

Немченко Ульяна Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)

Шабанова Наталья Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)

Бухарова Екатерина Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН. (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)