

**ВНУТРИВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫЙ ТРАКТ ЧЕЛОВЕКА**

В работе представлены результаты анализа внутривидовой гетерогенности 4 видов бифидобактерий: *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum* и *B. dentium*, колонизирующих толстый кишечник людей различных возрастных групп. Методом ПЦР с праймерами к коротким нуклеотидным повторам у всех исследованных видов выявлен высокий уровень внутривидовой изменчивости. На основании результатов ПЦР-анализа с использованием невзвешенного парно-группового метода средних (UPGMA) построена дендрограмма генетических взаимоотношений изученных бифидобактерий. Штаммы сформировали группы согласно их видовой принадлежности.

Ключевые слова: бифидобактерии, внутривидовая изменчивость, ПЦР, короткие нуклеотидные повторы.

Бифидобактерии относятся к наиболее важной группе микроорганизмов, присутствующих в биоценозе пищеварительного тракта человека. Род *Bifidobacterium* относится к семейству *Bifidobacteriaceae* и насчитывает более тридцати видов. Типовым видом, согласно определителя Bergey's Manual (1986), является *Bifidobacterium bifidum* [5]. Этот вид бифидобактерий формирует бифидофлору младенца в неонатальном возрасте.

Систематическое положение бифидобактерий до сих пор является предметом дискуссий. Это, в первую очередь, связано с вариабельностью их морфологии. Пристальное внимание исследователей к этим бактериям свидетельствует о том, что морфологические изменения бифидобактерий зависят как от условий их обитания и культивирования, так и от состава питательных сред, возраста культуры и др., что еще больше усложняет их идентификацию [15]. Однако исследование только фенотипических свойств с применением микробиологических методов диагностики не дает возможности четкого определения видовой принадлежности бифидобактерий.

Основные природные функции бифидобактерий заключаются в высокой биологической активности, защите макроорганизма от влияния неблагоприятных факторов окружающей среды и стимуляции иммунной системы. Эти свойства положены в основу создания пробиотиков с использованием бифидобактерий [4, 11].

В последнее время с развитием молекулярно-генетических методов, одним из которых является полимеразная цепная реакция (ПЦР), стало возможным оценить разнообразие видов бифидобактерий, обитающих в конкретном биотопе организма человека [14, 15]. Анализ генетического материала с последующей идентификацией различий внутри вида даст возможность по-новому сгруппировать бифидобактерии, оценить статус каждого вида, его физиологических свойств и экологической роли.

Целью этой работы является анализ и оценка внутривидового разнообразия бифидобактерий, колонизирующих толстый кишечник людей различных возрастных групп.

Материалы и методы. В работе были использованы 65 штаммов бифидобактерий, изолированных из содержимого дистального отдела кишечника людей разного возраста, и 2 типовых штамма – *B. animalis* ССМ 4988 и *B. longum* ССМ 4990 (Чешская коллекция микроорганизмов).

Состав питательной среды и условия культивирования бифидобактерий приведены в работе [2].

Геномную ДНК выделяли из клеточной суспензии с помощью набора «ДНК-сорб В» («Амплисенс», Россия), согласно руководству производителя. Идентификацию штаммов проводили методом ПЦР с видоспецифическими праймерами, как указано в работах [9, 12].

Анализ внутривидовой изменчивости выполняли с помощью ПЦР с праймером M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') и праймерами к нуклеотидным повторам (AG)₈CT, (GTG)₅, (GACA)₄. Последовательность праймеров к нуклеотидным повторам была выбрана с учетом их встречаемости в геноме *B. longum* NCC2705, согласно базе данных MICAS [16]. Реакцион-

ная смесь объемом 25 мкл содержала 5x ПЦР-буфер («Амплиценс», Россия), 2 mM каждого dNTPs, 15 pmol праймера, 2,5 U Taq-полимеразы («Амплиценс», Россия), 30 нг ДНК-матрицы и 25 мкл минерального масла. ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Использовали следующие температурные режимы: 94 °С, 2 мин; 40 циклов – 94 °С, 1 мин; 42 °С, 30 сек; 72 °С, 2 мин; заключительная элонгация – 72 °С, 10 мин (с праймером M13); 94 °С, 2 мин; 45 циклов – 94 °С, 30 сек; 52 °С, 45 сек; 72 °С, 2 мин; заключительная элонгация – 72 °С, 7 мин (с праймерами к нуклеотидным повторам).

Продукты амплификации разделяли в 1,7 % агарозном геле, содержащем 0,01 % бромистого этидия. Результаты визуализировали в УФ-свете, полученные электрофореграммы обрабатывали с помощью программы Gel Imager («ДНК-технология», Россия).

Проведен филогенетический анализ взаимоотношений бифидобактерий с использованием программ PhyIip 3.69 [8] и MEGA4 [19].

Результаты и их обсуждение. Видовая идентификация штаммов. Штаммы бифидобактерий, изолированные из содержимого дистального отдела кишечника людей разного возраста, были идентифицированы с помощью множественной ПЦР. Этот метод использовался многими исследователями с целью определения вида молочнокислых бактерий и бифидобактерий [1, 7]. Поскольку в одной ПЦР-смеси находятся несколько пар праймеров к разным видам, он позволяет сократить количество проведенных реакций и время, затраченное на идентификацию.

С помощью множественной ПЦР было установлено, что исследованные штаммы относятся к 4 видам: *B. longum* (15 штаммов), *B. animalis subsp. lactis* (8 штаммов), *B. bifidum* (24 штамма) и *B. dentium* (18 штаммов) (рис. 1). Представители вида *B. dentium* были обнаружены исключительно у людей пожилого возраста (> 63 лет), тогда как штаммы остальных видов были выявлены только у детей (1–2 года). Этот факт может свидетельствовать о возможном наличии определенных видов бифидобактерий в зависимости от возраста хозяина. Подобное предположение было высказано в работе Turgoni и др., показавших такую зависимость для небольшого количества видов бифидобактерий [20].

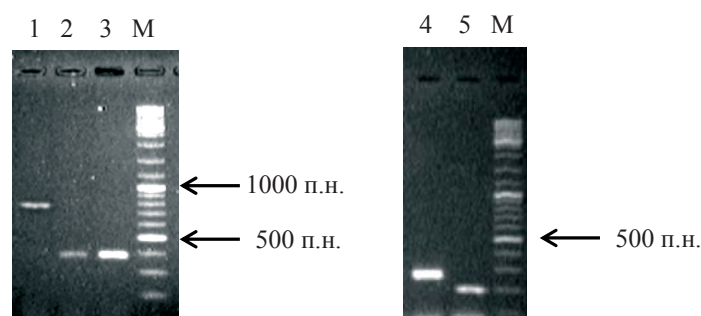


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации с видоспецифическими праймерами: М – маркер молекулярного веса GeneRuler™ DNA Ladder Mix;

1 – *B. longum*; 2, 3 – *B. dentium*; 4 – *B. bifidum*; 5 – *B. animalis subsp. lactis*.

Анализ внутривидовой изменчивости. Бактериальный геном содержит большое количество повторяющейся ДНК, локализованной как в его кодирующей, так и некодирующей части [21]. Нуклеотидные повторы отличаются размером повторяющейся единицы, протяженностью или количеством повторов, ориентацией, расположением и др. [18]. С целью изучения внутривидовой изменчивости бифидобактерий в нашей работе был использован универсальный праймер M13, содержащий минисателлитный повтор, и праймеры к коротким повторам, с размером повторяющейся единицы от 2 до 4 нуклеотидов. Такие повторы наиболее подвержены вариабельности количества повторяющихся единиц [21], т.е. представляют высокополиморфные участки генома. Таким образом, отличия в спектрах продуктов амплификации будут обусловлены протяженностью повтора.

Анализ электрофореграмм фрагментов ПЦР с праймерами к нуклеотидным повторам позволил охарактеризовать спектры ампликонов у каждого из исследованных видов, при этом учитывали общее количество фрагментов, их размер и количество полиморфных ампликонов.

В результате было показано, что все использованные в работе праймеры оказались полиморфными, а размер и количество продуктов ПЦР зависели от последовательности праймера. У трех видов бифидобактерий (*B. longum*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. dentium*) максимальное количество ПЦР-фрагментов обнаружено при использовании праймера к тетра nukлеотидному повтoру, а минимальное – к трехнуклеотидному. У *B. bifidum* наблюдали обратную зависимость: максимальное количество – при использовании праймера (GTG)₅, минимальное – при (GACA)₄. Процент полиморфных ампликонов, рассчитанный у каждого вида при использовании отдельного праймера, составил во всех случаях выше 90 %, что свидетельствует о высоком уровне внутривидовой изменчивости у исследованных видов бифидобактерий. Основные характеристики общего для всех видов спектра ПЦР-фрагментов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика общего спектра ПЦР-фрагментов у бифидобактерий

Праймер	Размер ампликонов, п.н.	Общее количество ампликонов	Минимальное количество ампликонов	Максимальное количество ампликонов
M13	200 – 2000	13	7	10
(AG) ₈ CT	250 – 1000	13	7	12
(GTG) ₅	250 – 3000	15	5	11
(GACA) ₄	250 – 3000	35	5	16

Для количественной оценки генетической дивергенции между видами бифидобактерий были рассчитаны значения генетического расстояния Нея-Ли [13]. Этот показатель широко используется в молекулярно-генетических исследованиях для анализа множественных локусов. Он выражает степень различия множества ампликонов между образцами, учитывая структуру праймера. В результате проведенных расчетов показано, что среднее значение генетического расстояния в каждой группе (внутривидовое разнообразие) составляет 0,02 у видов *B. longum*, *B. animalis subsp. lactis* и *B. dentium*, а у *B. bifidum* – 0,01. Значение генетического расстояния между видами бифидобактерий варьировало от 0,02 до 0,032. Наименьшее значение выявлено между видами *B. dentium* и *B. bifidum*, наибольшее – *B. bifidum* и *B. animalis subsp. lactis*.

На основании рассчитанных значений генетического расстояния была построена дендрограмма взаимоотношений видов бифидобактерий (рис. 2). Обнаружено, что все исследованные штаммы сформировали два кластера: первый включает *B. dentium*, *B. longum* и *B. animalis subsp. lactis*, а второй состоит из *B. bifidum* и *B. animalis subsp. lactis*. Следует отметить, что дифференциация штаммов произошла согласно их видовой принадлежности: каждый из видов образует отдельную группу, за исключением *B. animalis subsp. lactis*, формирующего небольшие группы (2–4 штамма), которые входят в состав кластеров других видов. Возможно, это обусловлено особенностями распределения нуклеотидных повтoров и большей, по сравнению с другими исследованными видами, пластичностью генома *B. animalis subsp. lactis*.

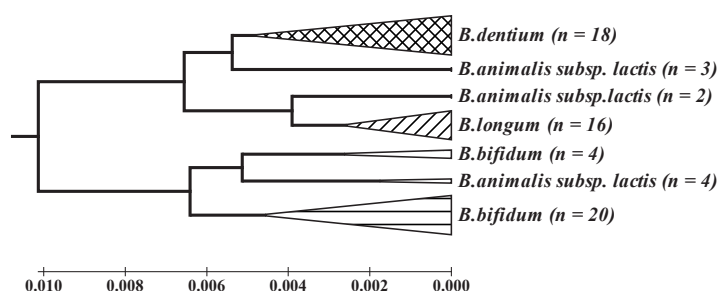


Рис. 2. Дендрограмма взаимоотношений видов бифидобактерий, построенная на основании значений генетического расстояния Нея-Ли, с использованием метода UPGMA.

С развитием методов молекулярно-генетического анализа изучение геномной изменчивости бактерий стало возможным с применением в качестве ДНК-маркеров разнообразных нуклеотидных повтoров. В большинстве случаев их используют с целью молекулярного типирования и дифференциации микроорганизмов. Примером таких повтoров являются ERIC,

REP, BOX повтори, обнаруженные в геноме многих бактерий и относящиеся к разным классам прокариотических диспергированных повторяющихся элементов [10]. Применение другого типа бактериальных повторов, в частности коротких повторов, связано с изучением их участия в адаптационных процессах. Мониторинг изменения протяженности коротких нуклеотидных повторов позволяет исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенности микроорганизмов [21]. Кроме того, показана также возможность использования коротких повторов для идентификации и типирования клинических изолятов патогенных микроорганизмов [3, 6, 17].

В нашей работе мы провели анализ внутривидовой изменчивости бифидобактерий. Результаты исследований показали, что короткие нуклеотидные повторы являются высокополиморфными маркерами, что делает их удобным инструментом для изучения геномной гетерогенности бифидобактерий. С использованием этого типа ДНК-маркеров выявлен высокий уровень внутривидовой изменчивости у всех проанализированных нами видов бифидобактерий, а на дендрограммах генетических взаимоотношений, построенных на основании результатов ПЦР-анализа, исследуемые штаммы сформировали группы согласно их видовой принадлежности. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о возможности применения коротких нуклеотидных повторов для дифференциации и молекулярного типирования бифидобактерий.

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

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ВНУТРІШНЬОВИДОВЕ РІЗНОМАНІТТЯ БІФІДОБАКТЕРІЙ, ЩО КОЛОНІЗУЮТЬ ШЛУНКОВО-КИШКОВИЙ ТРАКТ ЛЮДИНИ

Резюме

У роботі подані результати аналізу внутрішньовидової гетерогенності 4 видів бифидобактерій: *B. longum*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. bifidum* і *B. dentium*, що колонізують товстий кишечник людей різних вікових груп. Методом ПЛР з праймерами до коротких нуклеотидних повторів у всіх досліджених видів виявлено високий рівень внутрішньовидової мінливості. На основі результатів ПЛР-аналізу з використанням незваженого парно-групового методу середніх (UPGMA) побудована дендрограма генетичних взаємовідносин досліджених бифидобактерій. Штами сформували групи відповідно до їх видової належності.

Ключові слова: бифидобактерії, внутрішньовидова мінливість, ПЛР, короткі нуклеотидні повтори.

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

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

INTRASPECIES VARIABILITY OF BIFIDOBACTERIA COLONIZING HUMAN GASTRO-INTESTINAL TRACT

S u m m a r y

The results of intraspecies heterogeneity analysis of 4 bifidobacterial species, *B. longum*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. bifidum* and *B. dentium* colonizing intestines of people of different age groups are presented in the paper. A high level of intraspecies variability has been revealed for all species using PCR with primers to short nucleotide repeats. The dendrogram of genetic relationships between bifidobacteria has been constructed on the basis of results of PCR-analysis with the unweighted pair group method of arithmetic mean (UPGMA). Strains analyzed have formed groups according to their species designation.

The paper is presented in Russian.

Key words: bifidobacteria, intraspecies variability, PCR, short nucleotide repeats

The author's address: *L.B.Zelena*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Сидоренко А.В., Новик Г.И., Акимов В.Н. Использование методов геносистематики в классификации и идентификации бактерий рода *Bifidobacterium*. // Микробиология. – 2009. – 77, № 3. – С. 293–302.
2. Полтавська О.А., Коваленко Н.К. Антагоністичні властивості біфідобактерій, ізольованих із різних природних джерел. // Микробиол. журн. – 2005. – 67, № 2. – С. 70–80.
3. Ablordey A, Fonteyne P.A., Stragier P, Vandamme P, Portaels F. Identification of a new variable number tandem repeat locus in *Mycobacterium ulcerans* for potential strain discrimination among African isolates // Clin. Microbiol. Infect. – 2007. – 13, N 7. – P. 734–736.
4. Backhed F, Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine // Science. – 2005. – 307. – P. 1915–1920.
5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* // Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. – 2. – P. 1413–1434.
6. Brudey K, Driscoll J.R, Rigouts L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology // BMC Microbiol. – 2006. – 6. – P. 6–23.
7. Desai R., Shah N.P., Powell I.B. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group // J. Dairy Sci. – 2006. – 89. – P. 3345–3351.
8. Felsenstein J. PHYLIP-Phylogeny inference package (Version 3.2) // Cladistics. – 1989. – 5. – P. 164–166.
9. Kwon H.-S., Yang E.-H., Lee S.-H., Yeon S.-W., Kang B.-H., Kim T.-Y. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA // FEMS Microbiology Letters. – 2005. – 250, N 1. – P. 55–62.
10. Lupski J.R., Weinstock G.M. Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes // J. Bacteriol. – 1992. – 174. – P. 4525–4529.
11. Marco M.L., Pavan S., Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action // Curr. Opin. Biotechnol. – 2006. – 17. – P. 204–210.
12. Mullie C., Odou M.-F., Singer E., Romond M.-B., Izard D. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin // FEMS Microbiology Letters. – 2003. – 222. – P. 129–136.
13. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // PNAS. – 1979. – 76. – P. 5269–5273.
14. Rajilic-Stojanovic M., Smidt H., de Vos W.M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited // Environ. Microbiol. – 2007. – 9. – P. 2125–2136.
15. Reuter G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession // Curr. Issues Intest. Microbiol. – 2001. – 2. – P. 43–53.
16. Sreenu V.B., Alevoor V., Nagaraju J., Nagarajaram H.A. MICdb: database of prokaryotic microsatellites // Nucleic Acids Research. – 2003. – 31. – P. 106–108.
17. Shinde V., Newton H., Sakamuri R.M., Reddy V., Jain S., Joseph A., Gillis T., Nath I., Norman G., Vissa V. VNTR typing of *Mycobacterium leprae* in South Indian leprosy patients // Lepr Rev. – 2009. – 80, N 3. – P. 290–301.
18. Smirnov G.V. Repeats in bacterial genome: evolutionary considerations // Microbiology and Virology. – 2010. – 25, N 2. – P. 56–65.
19. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – 24. – P. 1596–1599.
20. Turroni F., Foroni E., Pizzetti P., Giubellini V., Ribbera A., Merusi P., Cagnasso P., Bizzarri B., de'Angelis G.L., Shanahan F., van Sinderen D., Ventura M. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – 75, N 6. – P. 1534–1545.
21. van Belkum A., Scherer S., van Alphen L., Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes // Microbiology and Molecular Biology. – 1998. – 62, N 2. – P. 275–293.

Отримано 16.11.2010