https://www.proconference.org/index.php/usc/article/view/usc20-01-005
DOI: 10.30888/2709-2267.2023-20-01-005

УДК 616.34-008.9:579.864:579.262]-053.31

THE ROLE OF BACTERIA OF THE GENUS BIFIDOBACTERIUM IN THE MICROBIOME OF THE COLON OF CHILDREN AGE 8-90 DAYS

РОЛЬ БАКТЕРІЙ РОДУ BIFIDOBACTERIUM У МІКРОБІОМІ ТОВСТОЇ КИШКИ ДІТЕЙ ВІКОМ 8-90 ДНІВ

Mikheev A.A. / Міхєєв А.О.
PhD, associate professor / к.б.н.,доцент
ORCID: 0000-0003-2163-8866
Gavryliuk O.I. / Гаврилюк О.І.
Assistant / асистент
ORCID: 0000-0002-5461-6797
Dzhuryak V.S. / Джуряк В.С.
PhD, associate professor / к.б.н.
ORCID: 0000-0002-8810-3164
Sydorchuk L.I. / Сидорчук Л.І.
PhD, associate professor / к.мед.н.,доцент
ORCID: 0000-0003-1275-1867
Blinder O.O. / Бліндер О.О.
PhD, associate professor / к.мед.н.,доцент
ORCID: 0000-0002-5855-5549
Bukovinian State Medical University, 2, Theatralna sq., Chernivtsi-city, 58002
Буковинський державний медичний університет, Театральна площа, 2, м.Чернівці, 58002

Анотація. *У статті розглядається роль бактерій роду Bifidobacterium у мікробіомі товстої кишки дітей віком 8-90 днів від народження. Показано, що мікробіом товстої кишки дітей віком від 8-90 днів формується з таксонів головної мікробіоти (Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteroides, Peptostreptococcus, E. coli, Staphylococcus) та додаткової (Propionibacterium, P. mirabilis). За мікроекологічними показниками екосистеми «макроорганізм-мікробіом» симбіотичної мікробіоти товстої кишки при цьому переважають облігатні анаеробні бактерії. У сформованому симбіотичному мікробіомі товстої кишки домінують бактерії роду Bacteroides. Підтримку динамічного мікроекологічного гомеостазу товстої кишки у дітей 8-90 днів здійснюють провідні таксони роду Bifidobacterium, які проявляють високу антагоністичну активність відносно патогенних видів та умовно-патогенних мікроорганізмів та продукують речовини, які проявляють бактеріостатичну дію.*

Ключові слова: *діти віком 8-90 днів, симбіотичний мікробіом, товста кишка, мікробіота, мікроекологічний гомеостаз.*

Abstract. *The article considers the role of Bifidobacterium bacteria in the colon microbiome of children aged 8-90 days from birth. It has been shown that the microbiome of the colon of*

children aged 8-90 days is formed from the main microbiota (Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteroides, Peptostreptococcus, E. coli, Staphylococcus) and additional (Propionibacterium, P. mirabilis) taxa. According to the microecological indicators of the "macroorganism-microbiome" ecosystem of the symbiotic microbiota of the colon, obligate anaerobic bacteria prevail. The formed symbiotic microbiome of the colon is dominated by bacteria of the Bacteroides genus. The maintenance of the dynamic microecological homeostasis of the colon in children 8-90 days old is carried out by the leading taxa of the Bifidobacterium genus, which exhibit high antagonistic activity against pathogenic species and opportunistic microorganisms and produce substances that exhibit bacteriostatic effects.

Key words: *children aged 8-90 days, symbiotic microbiome, large intestine, microbiota, microecological homeostasis.*

Вступ.

У товстій кишці людини знаходиться до 60% індигенної мікробіоти, а також розміщено майже 85% лімфоїдної тканини слизових оболонок. Вплив мікробіоти слизової оболонки при цьому на імунну систему має значно більше значення, ніж сама стимуляція факторів протимікробної відповіді. А вирішальна роль у регуляції імунної відповіді найчастіше належить симбіотичним бактеріям, таким як *Bifidobacterium, Lactobacillus* та *Propionibacterium* [1].

Відповідно до сучасних наукових даних, облігатна автохтонна мікробіота товстої кишки переважно представлена грампозитивними і грамнегативними анаеробними цукролітичними бактеріями різних родів (*Bifidobacterium, Lactobacillus, Propionibacterium, Bacteroides*). Серед них найбільш фізіологічними для організму людини симбіонтами є представники родів *Bifidobacterium і Lactobacillus,* а також класичних таксонів родів *Propionibacterium* [2]. Найважливішими з них у мікробіоценозі товстого кишківника людини та у підтриманні мікроекологічного гомеостазу традиційно вважаються бактерії роду *Bifidobacterium.* Саме вони переважають у складі первинної фізіологічної мікробіоти, яка формується у неонатальному віці у здорового немовляти та є невід'ємною складовою нормальної мікрофлори дорослих людей будь-якого віку [3]. Головною функцією цієї мікробіоти є захист організму дитини від алохтонної патогенної та умовно-патогенної мікрофлори і створення умов для інтенсивного дозрівання механізмів імунної відповіді у перші періоди становлення імунної системи [4]. При цьому біфідобактерії домінують не тільки у товстій та клубовій кишці, але й заселяють порожню кишку. Велике значення має також здатність окремих

штамів біфідобактерій синтезувати різноманітні сполуки з антимікробною дією.

Як показав аналіз наявних літературних джерел значення бактерій роду *Bifidobacterium* у мікробіомі товстого кишківника дітей Північної Буковини не вивчався, тому є необхідність та актуальність дослідження взаємозв'язків в екосистемі «макроорганізм-мікробіом» дітей віком 8-90 днів (перший період становлення) імунної системи організму людини.

Метою дослідження було встановлення таксономічного складу, популяційного рівня і мікроекологічних показників екосистеми «макроорганізм-мікробіом» мікробіоти порожнини товстої кишки дітей віком 8-90 днів та вивчення значення у цьому біотопі бактерій роду *Bifidobacterium.*

Матеріали і методи дослідження. Мікробіологічне дослідження було проведене шляхом вивчення таксономічного складу та популяційного рівня окремих представників мікрофлори в вмісті порожнини товстої кишки (випорожненнях) у 126 дітей віком 8-90 днів від народження, серед яких було 65 дівчат (51,59%) і 61 хлопчик (48,41%). Перед отриманням клінічного матеріалу всі діти були оглянуті лікарем-педіатром, який і відбирав проби досліджуваного матеріалу. Всі мікробіологічні дослідження проведено згідно стандартних методик, описаних у попередніх роботах [5].

Антагоністичні властивості біфідобактерій стосовно патогенних та умовно патогенних бактерій визначали у змішаних культурах методом сумісного культивування у модифікованому середовищі Блаурока із застосуванням дводобових культур мікроба-антагоніста та 18-20 годинних культур тест-штамів з визначенням числа бактеріальних клітин, які вижили у досліді, а відсоток інгібіювання розраховували за стандартною формулою. Вивчення здатності бактерій роду *Bifidobacterium* синтезувати антимікробні компоненти проводили із використанням фільтратів триденних культур з допомогою фільтрів Зейтца та визначенням їх бактеріостатичної концентрації відносно патогенних та умовно патогенних бактерій. Адгезивну здатність біфідобактерій визначали на нативних еритроцитах крові людини (O(I), Rh+). Визначали середній показник адгезії (СПА) під імерсійним мікроскопом шляхом підрахунку клітин біфідобактерій на 25 еритроцитах: неадгезивні (СПА – 1-2 мікроби на 1 еритроцит), низькоадгезивні (СПА – 3-6), середньоадгезивні (7-10) і високоадгезивні – СПА (більше 10).

Опрацювання результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих статистичних методів для медико-біологічних досліджень.

Результати та їх обговорення.

Відповідно до розрахованого індексу постійності, частоти зустрічання, індексів видового багатства Маргалефа і різноманіття Уіттекера, а також індексів видового домінування Сімпсона і Бергера-Паркера головна мікробіота у складі мікробіому товстої кишки дітей І періоду становлення імунної системи (8-90 днів) представлена автохтонними облігатними анаеробними бактеріями родів *Bifidobacterium, Bacteroides, Lactobacillus* і *Peptostreptococcus;* а також факультативними анаеробними та аеробними *E. coli* і *Staphylococcus;* додаткова – *P. mirabilis* та *Propionibacterium;* випадкова – *Saccharomyces vini Cheres* (дитина вживала дитячий кефір), окремі ентеробактерії (*C. freundii, H. alvei, S. marcescens, P. vulgaris, P. niger, C. albicans* та ін.).

Відповідно до цього та за всіма вивченими нами показниками, у мікробіоті товстої кишки дітей віком 8-90 днів переважає облігатна анаеробна мікрофлора. Зокрема, згідно індексу постійності облігатні анаеробні бактерії переважають аеробні у 3 рази, за частотою зустрічання – у 4 рази, згідно індексу видового багатства Маргалефа – у 5 разів, індексу різноманіття Уіттекера – у 3 рази, індексу видового домінування Сімпсона – у 2 рази та індексу Бергера-Паркера – у 3 рази. При цьому популяційний рівень анаеробних бактерій перевищує аналогічний у факультативних анаеробних та аеробних мікроорганізмів на 48%, коефіцієнт кількісного домінування – у 3 рази, коефіцієнт значущості – у 3 рази. Найважливішим є показник участі таксону у саморегуляції мікробіому біотопу, який в облігатних анаеробних бактерій перевищує аналогічний у аеробних у 4 рази.

Отже, мікробіом товстої кишки дітей віком від 8 до 90 днів сформований переважно облігатними анаеробними бактеріями родів *Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteroides, Peptostreptococcus* та аеробними *E. coli, Staphylococcus* (головна мікробіота) та додатковими таксонами *Propionibacterium* та *P. mirabilis.* За мікроекологічними показниками екосистеми «макроорганізм-мікробіом» облігатні анаеробні бактерії переважають у декілька разів аналогічні показники в аеробних. У дітей сформований мікробіом, в якому домінують бактерії, що відносять до ентеротипу *Bacteroides* (популяційний рівень 9,77±0,41 lg КУО/г). При цьому такий ентеротип встановлено у 39% дітей. У 42% дітей встановлений ентеротип *Firmicutes* з популяційним рівнем 8,64±0,27 lg КУО/г та у 19% дітей виявлено ентеротип *Actinobacteria*. У мікробіомі товстої кишки здорових дорослих людей

домінують переважно бактерії, які відносяться до ентеротипів *Firmicutes* (65-80%), *Bacteroides* (біля 23%) та *Actinobacteria* (3%). Відповідно до цього, такі вікові властивості представників мікробіому товстої кишки повинні враховуватися у профілактиці захворювань, до яких можуть бути схильні люди різного віку з урахуванням конкретного ентеротипу: *Bacteroides* – ризик виникнення ожиріння, *Prevotella* – ризик розвитку виразкової хвороби тощо.

Відповідно до поставленої мети, а таксономічний склад бактерій роду *Bifidobacterium,* який персистує у дітей Буковини до цього не вивчався, нами було також проведене дослідження таксономічного складу, популяційного рівня та мікроекологічних показників біфідобактерій, що формують мікробіом товстої кишки дітей у першому періоді становлення імунної системи.

Як було з'ясовано, підтримку мікроекологічного гомеостазу у дітей віком 8-90 днів у товстому кишківнику здійснюють три провідні таксони біфідобактерій (*B. longum, B. breve* і *B. adolescentis*) – їх персистенція була встановлена у 93% обстежених дітей. Серед них провідне значення належить *B. longum.* Ці бактерії мали при цьому найвищій популяційний рівень та мікроекологічні показники екосистеми «макроорганізм-мікробіом» у мікробіоті товстої кишки. Таксономічний склад біфідобактерій у мікробіомі кишківника пов'язаний із рядом позитивних ефектів, які реалізуються завдяки їх високому популяційному рівню у товстій кишці. Головними фізіологічними функціями біфідобактерій в організмі людини є: участь в реалізації механізмів колонізаційної резистентності слизових оболонок кишківника та участь у метаболічних процесах (травлення, метаболізм жовчних кислот, холестерину, гормонів, ксенобіотиків тощо). Внесок біфідофлори у протиінфекційний захист організму людини реалізується як через прямий вплив на патогенні та умовно патогенні бактерії шляхом конкуренції за поживні інгредієнти адгезії, так і через синтез антимікробних компонентів.

Встановлено, що види біфідобактерій ізольованих із товстої кишки дітей віком 8-90 днів проявляють антагоністичну активність стосовно таких патогенних бактерій, як *S. sonnei, S. flexneri, S. typhi, S. typhimurium,, MRSA* та умовно патогенних *C. freundii K. pneumoniae, E. acrogenes, S. marcenscens, H. alvei*. Антагоністичні властивості біфідобактерій при цьому безпосередньо залежить від природи таксона (штама) та тест-мікроба. Найбільше пригнічення росту і розмноження здійснювали всі виявлені таксони біфідобактерій відносно *V. metchnicovii, MRSA, E. faecalis*, *S. typhi*, *C. freundii* та інші, а низький рівень

антагонізму біфідобактерій встановлений відносно *E. coli K12.*

Однією із важливих проблем сучасної мікробіології та мікроекології екосистеми «організм-мікробіом», особливо мікробіоти товстої кишки є вивчення адгезивності автохтонної фізіологічно корисної мікробіоти. Адгезія відіграє при цьому провідну роль при контамінації та колонізації слизових оболонок мікробіотою та сприяє колонізаційній резистентності слизових оболонок з формуванням неспецифічного антимікробного захисту. Адгезія у біфідобактерій зокрема розглядається як один із симбіотичних факторів мікробіоти кишківника, а захисні властивості бактерій роду *Bifidobacterium* можливо пов'язані саме з її адгезивною активністю.

Вивчення адгезивних властивостей ізольованих найважливіших у складі біотопу товстої кишки, які проявляють антагоністичну активність і продукують антимікробні речовини, показало, що такими є наступні представники біфідобактерій: *B. longum, B. breve* та *B. adolescentis.* Саме вони проявляють адгезивний ефект стосовно еритроцитів людини (за класичною методикою вивчення адгезії) і рівень їх адгезивності залежить від таксону. Високоадгезивні штами виділених нами у дітей 8-90 днів від народження біфідобактерій за ефективністю можливо розмістити у такий ряд за здатністю до адгезії: *B. adolescentis > B. longum > B. breve;* середньоадгезивні за здатністю до адгезії відповідно – *B. breve > B. adolescentis > B. longum.*

Таким чином, одержані ними дані чітко вказують на наявність різного ступеня адгезивності у біфідобактерій, ізольованих із вмісту товстої кишки дітей віком 8-90 днів, а адгезивна активність залежить від таксону.

Висновки:

1. Мікробіом товстої кишки дітей віком від 8-90 днів формується з таксонів головної мікробіоти (*Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteroides, Peptostreptococcus, E. coli, Staphylococcus*) та додаткової (*Propionibacterium, P. mirabilis*). За мікроекологічними показниками екосистеми «макроорганізм-мікробіом» симбіотичної мікробіоти товстої кишки при цьому переважають облігатні анаеробні бактерії.

2. У сформованому симбіотичному мікробіомі товстої кишки домінують бактерії роду *Bacteroides*, що дає можливість встановлення у них ентеротипу *Bacteroides.* У 42% дітей встановлений ентеротип *Firmicutes*, а у 19% – ентеротип *Actinobacteria*.

3. Підтримку динамічного мікроекологічного гомеостазу товстої кишки у

дітей 8-90 днів здійснюють провідні таксони *B. longum, B. breve* та *B. adolescentis*. При цьому вони проявляють високу антагоністичну активність відносно патогенних видів *S. sonnei, S. flexneri, S. typhi, S. typhimurium, MRSA* та умовно-патогенних *E. faecalis, C. freundii, K. pneumoniae, E. aerogenus, S. marcescens, H. alvei, C. albicans* мікроорганізмів та продукують речовини, які проявляють бактеріостатичну дію.

4. Провідним фактором симбіотичної мікробіоти є адгезія. Відповідно, за високим рівнем адгезії біфідобактерії розташовуються в такий ряд: *B. adolescentis > B.longum > B.breve;* середньоадгезивні відповідно – *B. breve > B. adolescentis > B.longum.*

Література:

1. Henrick, B. M., Rodriguez, L., Lakshmikanth, T., Pou, C., Henckel, E., Arzoomand, A., ... & Brodin, P. (2021). Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. Cell, 184(15), 3884-3898.; Jeong, J. J., Park, H. J., Cha, M. G., Park, E., Won, S. M., Ganesan, R., ... & Suk, K. T. (2022). The Lactobacillus as a probiotic: focusing on liver diseases. Microorganisms, 10(2), 288.

2. Tannock, G. W. (2022). Exploring bacterial attributes that underpin symbiont life in the monogastric gut. Applied and Environmental Microbiology, 88(18), e01128-22.

3. Moore, R. E., & Townsend, S. D. (2019). Temporal development of the infant gut microbiome. Open biology, 9(9), 190128.

4. Sanidad, K. Z., & Zeng, M. Y. (2020). Neonatal gut microbiome and immunity. Current opinion in microbiology, 56, 30-37.

5. Міхєєв, А. О., Сидорчук, Л. І., Джуряк, В. С., & Сидорчук, І. Й. (2023). Основні показники мікробіому товстої кишки людей раннього працездатного віку. In The 6th International scientific and practical conference “Scientific directions of research in educational activity”(February 14–17, 2023) Osaka, Japan. International Science Group. 2023. 545 p. (p. 236).

Стаття надіслана:18.09.2023

© Міхєєв А.О., Гаврилюк О.І., Джуряк В.С., Сидорчук Л.І., Бліндер О.О.