

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОГО, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕТОДОВ В ИССЛЕДОВАНИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ДЕТЕЙ

Б. А. Ефимов ✉, А. В. Чаплин, С. Р. Соколова, З. А. Черная, А. П. Пикина, А. М. Савилова, Л. И. Кафарская

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

В последние десятилетия основными методами оценки состава микробиоты стали технологии секвенирования нуклеиновых кислот, используемые для метагеномного анализа. В то же время внедрение в практику микробиологических исследований новых методов культивирования и идентификации микроорганизмов привело к ренессансу культуральных технологий, поскольку позволило решить задачи по поиску и выделению новых штаммов как уже известных микроорганизмов, так и ранее некультивируемых и неизученных бактериальных таксонов. Целью работы было оценить потенциал использования культурального метода для оценки качественного и количественного состава кишечной микробиоты здоровых детей. Анализ состава доминирующих групп анаэробных бактерий, а также аэробных бактерий и грибов у 20 здоровых детей в возрасте 2–4 лет проводили путем высева серийных разведений фекалий на 11 питательных сред. Для идентификации микроорганизмов использовали метод MALDI TOF MS и секвенирование фрагмента гена 16S рРНК. Идентификация 1819 выделенных штаммов микроорганизмов показала, что они принадлежали к 7 типам, 13 классам, 18 порядкам, 33 семействам, 77 родам и 149 видам домена бактерий. По количеству и частоте встречаемости доминировали бактерии типов *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Наибольшее видовое разнообразие (более 85 видов) обнаружено среди бактерий типа *Firmicutes*. Выделено 10 штаммов новых, пока не охарактеризованных бактериальных видов.

Ключевые слова: микробиота кишечника, дети, выделение бактерий, биоразнообразие, микробиологические методы, секвенирование ДНК, масс-спектрометрия, MALDI TOF MS

Финансирование: работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 17-15-01488).

Информация о вкладе авторов: Б. А. Ефимов — планирование исследования, анализ литературы, отбор обследуемых детей, сбор биоматериала, микробиологическое исследование, спектрометрическое исследование, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; А. В. Чаплин — планирование исследования, анализ литературы, выделение бактериальной ДНК, проведение ПЦР, очистка ампликонов для секвенирования, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; С. Р. Соколова — планирование исследования, анализ литературы, сбор биоматериала, микробиологическое исследование, выделение бактериальной ДНК, проведение ПЦР, очистка ампликонов для секвенирования, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; З. А. Черная — планирование исследования, анализ литературы, микробиологическое исследование, спектрометрическое исследование, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; А. П. Пикина — планирование исследования, анализ литературы, микробиологическое исследование, спектрометрическое исследование, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; А. М. Савилова — анализ литературы, микробиологическое исследование, подготовка черновика рукописи; Л. И. Кафарская — планирование исследования, анализ литературы, отбор обследуемых детей, микробиологическое исследование, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование было одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 165 от 22 мая 2017 г.). Родители каждого ребенка подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Борис Алексеевич Ефимов
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; efimov_ba@mail.ru

Статья получена: 27.06.2019 **Статья принята к печати:** 12.07.2019 **Опубликована онлайн:** 09.08.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.048

APPLICATION OF CULTURE-BASED, MASS SPECTROMETRY AND MOLECULAR METHODS TO THE STUDY OF GUT MICROBIOTA IN CHILDREN

Efimov BA ✉, Chaplin AV, Sokolova SR, Chernaya ZA, Pikina AP, Savilova AM, Kafarskaya LI

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In recent decades, nucleic acid sequencing technologies used for metagenomic analysis have become the main methods for assessing the composition of microbiota. At the same time, the use of novel methods of cultivation and identification of microorganisms in microbiological research led to the renaissance of culture-based technologies, because facilitated the discovery and isolation of both new strains of well-known microorganisms as well as uncultivated and unexplored bacterial taxa. The aim of this study was to evaluate the potential of using the culture-based method for the assessment of the qualitative and quantitative composition of the intestinal microbiota in healthy children. Eleven growth media were inoculated with serial dilutions of stool samples in order to analyze the profile of dominant anaerobic bacteria, as well as aerobic bacteria and fungi in 20 healthy children aged 2–4 years. The identification of microorganisms was performed using MALDI TOF MS and 16S rRNA gene fragment sequencing were used. 1,819 isolated and identified strains belong to 7 phyla, 13 classes, 18 orders, 33 families, 77 genera and 149 species in the *Bacteria* domain. The *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* phyla were most abundant and frequent. The greatest species diversity (more than 85 species) was found in the *Firmicutes* phylum. Ten new previously uncharacterized bacterial strains were isolated.

Keywords: gastrointestinal tract microbiota, children, isolation and purification of bacteria, biodiversity, microbiological techniques/methods, DNA sequencing, mass spectrometry, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization

Funding: the study was supported by Russian Science Foundation (research grant № 17-15-01488).

Author contribution: Efimov BA — research planning, literature analysis, screening children, specimen collection, microbiological research, mass spectrometry research, analysis and interpretation of data, preparing a draft manuscript; Chaplin AV — research planning, literature analysis, isolation of bacterial DNA, carrying out PCR, amplicons purification for sequencing, data analysis and interpretation, preparing a draft manuscript; Sokolova SR — research planning, literature analysis, specimen collection, microbiological research, isolation of bacterial DNA, carrying out PCR, amplicons purification for sequencing, data analysis and interpretation preparing a draft manuscript; Chernaya ZA — research planning, literature analysis, microbiological research, mass spectrometry research, data analysis and interpretation, preparing a draft manuscript; Pikina AP — research planning, literature analysis, microbiological research, mass spectrometry research, data analysis and interpretation, preparing a draft manuscript; Savilova AM — literature analysis, microbiological research, preparing a draft manuscript; Kafarskaya LI — research planning, literature analysis, screening children, microbiological research, analysis and interpretation of data, preparing a draft manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 165 of May 22, 2017). The parents of children participants signed a voluntary informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Boris A. Efimov
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; efimov_ba@mail.ru

Received: 27.06.2019 **Accepted:** 12.07.2019 **Published online:** 09.08.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.048

Большинство представителей микрофлоры кишечника человека и животных относят к трудно культивируемым или некультивируемым группам микроорганизмов, поэтому для оценки состава микробиоты в настоящее время преимущественно применяют технологии массового параллельного секвенирования молекул ДНК в исследуемом образце, например фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, или фрагментов геномной ДНК [1, 2]. Однако часто интерпретация получаемых данных вызывает затруднения, так как анализируемые нуклеотидные последовательности не всегда могут быть соотнесены с какими-либо известными бактериями или бактериофагами [3–5]. Эти подходы имеют и тот недостаток, что с их помощью с большей эффективностью можно охарактеризовать относительное соотношение доминирующих групп бактерий, в то время как точное численное содержание доминирующих или минорных по количеству (и не всегда по параметру качественного разнообразия и реализуемым функциям) таксонов остается за рамками таких исследований [6, 7]. Для более точного количественного определения бактерий применяют метод ПЦР в режиме реального времени с использованием видоспецифичных или группоспецифичных праймеров и последующей нормализацией полученных результатов на рекомбинантные плазмидные ДНК, содержащие клонированные участки амплифицируемых фрагментов генов [8]. Однако этот метод позволяет скорее определять общее количество копий амплифицируемых участков ДНК в исследуемом материале, а не число жизнеспособных бактериальных клеток. Кроме того, ввиду трудоемкости постановки метода, особенно в исследованиях, направленных на численное определение широкого спектра микроорганизмов, этот подход, в основном, используют для анализа состава крупных таксономических кластеров микроорганизмов (родов, семейств, групп), нежели отдельных известных видов. Таким образом, наряду с развитием технологий, основанных на секвенировании генетического материала микроорганизмов, по-прежнему актуально совершенствование методов их культивирования, поскольку оно позволяет решать задачи по поиску, выделению, определению численности и изучению биологических свойств новых штаммов уже известных бактерий, а также ранее не изученных таксонов [9].

Целью работы было оценить потенциал использования культурального метода для оценки качественного и количественного состава кишечной микробиоты здоровых детей путем посева образцов испражнений на часто используемые в лабораторной практике питательные среды, поддерживающие рост требовательных бактерий.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Изучение параметров микробной колонизации толстой кишки проводили у группы из 20 здоровых детей обоего пола, проживающих в г. Москва, 17 из которых регулярно посещали детские дошкольные учреждения, а трое детей находились на домашнем воспитании. Отбор детей проводили авторы исследования. Возраст обследуемых составил от 2 лет 11 месяцев до 4 лет 10 месяцев (средний возраст — 3 года 5 месяцев), из которых было 12 мальчиков и 8 девочек. Критерии включения: дети обоего пола; возраст детей от 2,5 до 4 лет; наличие согласия родителей на проведение исследования. Критерии исключения: дети иного возраста; наличие любого хронического заболевания, такого как сахарный диабет, бронхиальная астма, желудочно-

кишечные заболевания (целиакия, функциональный запор, синдром короткой кишки, или воспалительные заболевания кишечника); наличие пищевой аллергии или родительская убежденность в непереносимости лактозы у ребенка; выраженная избирательность в употреблении пищевых продуктов; применение антибиотиков, иммуномодулирующих, стероидных или пробиотических лекарственных препаратов в течение 6 месяцев до исследования; перенесенный за последние 6 месяцев до исследования инфекционный гастроэнтерит, подтвержденный лабораторными исследованиями; наличие перенесенных операций на желудочно-кишечном тракте.

Материалом для исследования служили фекалии детей, которые родители собирали стерильным шпательом и помещали в стерильный транспортный контейнер. Исследование проводили при условии, что количество помещенного в контейнер материала составляло не менее 15 г, и время его доставки в лабораторию не превышало 2 ч от момента забора. В лаборатории сразу после получения исследуемый материал гомогенизировали, готовили его десятикратные серийные разведения (от 10^8 до 10^9 раз) в пробирках со стерильной жидкой средой Schaedler Anaerobe Broth (Oxoid, Basingstoke; Великобритания) и высевали аликвоты в объеме 0,1 мл из соответствующих разведений на чашки Петри с питательными средами. Выделение строго анаэробных бактерий проводили на Schaedler Anaerobe Agar (Oxoid, Basingstoke; Великобритания) с добавлением 5% (v/v) дефибринированной бараньей крови, Anaerobe Basal Agar (Oxoid, Basingstoke; Великобритания) с добавлением бараньей крови, Columbia Agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile; France) с добавлением бараньей крови. Посев на питательные среды проводили из разведений испражнений в 10^7 , 10^8 , и 10^9 раз. Бифидобактерии и сульфатредуцирующие бактерии выделяли также на Bifidobacterium Agar (Himedia Labs Inc.; Индия) и Perfringens Agar Base (Himedia Labs Inc.; Индия) соответственно из разведений исследуемого материала в 10^5 , 10^7 и 10^8 раз. Чашки Петри с посевами инкубировали в анаэроаппаратах (Schutt Labortechnik GmbH; Германия), заполненных газовой смесью (85% N_2 , 10% H_2 , 5% CO_2), в присутствии платиновых катализаторов при 37 °C в течение 72 ч. Молочнокислые бактерии культивировали на среде Lactobacillus MRS Agar (Himedia Labs Inc.; Индия) из фекалий разведением в 10^3 и 10^5 раз, чашки инкубировали в анаэроаппаратах (GasPak; США) в атмосфере — 7% CO_2 48 ч. Аэробные бактерии выделяли из разведений исследуемого материала в 10^1 , 10^3 , 10^5 и 10^7 раз на средах: Endo Agar (Becton Dickinson and Company, США), Salmonella–Shigella–Agar (bioMérieux Marcy l'Etoile; Франция), Gelatin Mannitol Salt Agar (Staphylococcus Agar # 110, Himedia Labs Inc.; Индия), m-Enterococcus Agar (Difco Laboratories, Franklin Lakes; США), Columbia Agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile; Франция) с добавлением 5% (v/v) бараньей крови. Для выделения грибов использовали среду Sabouraud Chloramphenicol 2 Agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile; Франция).

После инкубирования чашек с посевами при макроскопическом исследовании выросших колоний определяли их морфологические типы и проводили подсчет отдельно для каждого типа. Кроме того, материал из колоний выявленных типов подвергали микроскопическому исследованию после окраски по Граму и субкультивировали путем пересева на новые чашки Петри с той же средой и последующим инкубированием чашек в анаэробных или аэробных условиях с целью получения биомассы бактерий

для идентификации и консервации. Частично, выделенные штаммы микроорганизмов сохраняли путем лиофильного высушивания микробной суспензии после замораживания в растворе 10% сахарозы/1% желатины (w/v) в лиофильной сушке SB1 (Chemlab; Великобритания). Пробирки с лиофильно высушенными штаммами микроорганизмов хранили при температуре -80°C .

Первичную идентификацию бактерий и грибов проводили при помощи масс-спектрометрического метода MALDI TOF MS на приборе Vitek MS Plus (bioMérieux; Франция) и программы Saramis Premium v. 4.10 в соответствии с рекомендациями производителя оборудования [10, 11]. Штаммы бактерий, видовую принадлежность которых не удалось установить при помощи метода MALDI-TOF масс-спектрометрии, идентифицировали путем секвенирования фрагмента гена 16S рПНК [12, 13]. Кроме того, этот же метод использовали выборочно для подтверждения правильности видовой идентификации бактерий методом масс-спектрометрии. Путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли амплификацию участка гена 16S рПНК с использованием универсальных бактериальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGYACCTTGTACGACTT-3') в течение 35 циклов со следующей программой: денатурация — 20 с при 94°C ; отжиг праймеров — 20 с при 58°C ; элонгация — 90 с при 72°C . Полученный ПЦР-продукт очищали с использованием набора Cleanup Standard («Евроген»; Россия). Секвенирование амплифицированного фрагмента ДНК по Сэнгеру с праймера UF1 проводили в компании «Евроген» (Москва, РФ). Определение границ отсечения последовательностей по качеству электрофореграммы осуществляли визуально с использованием программы Chromas Lite Chromas Lite, версия 2.6.6 (Technelysium Pty. Ltd.; Австралия). Видовую принадлежность бактерий устанавливали на основе поиска полученных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank при помощи алгоритма Megablast. Результат сравнения считали соответствующим уровню вида в том случае, когда его частично секвенированная последовательность гена 16S рПНК имела сходство на уровне $\geq 98,7\%$ с последовательностью ближайшего известного бактериального вида в базе данных GenBank [14].

Количество бактерий выражали в \log_{10} колониеобразующих единиц в 1 г исследуемого материала (\log_{10} КОЕ/г). КОЕ/г исследуемого материала было вычислено с использованием формулы: КОЕ/г = число колоний соответствующего вида микроорганизмов, выросших на чашке (или среднее число колоний соответствующего вида микроорганизмов, в случаях, когда бактерии одного вида давали рост на разных средах или давали рост только на одной из использованных сред, но определялись более чем в одном разведении) $\times 10 \times$ степень разведения. Общее количество культивированных микроорганизмов на образец вычисляли путем сложения количественных значений отдельных видов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Манна–Уитни и точного теста Фишера, поправку на множественные сравнения осуществляли с использованием метода Холма–Бонферрони. Тенденцию к образованию кластеров проверяли с использованием алгоритма VAT [15] и метода главных компонент.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

От 20 здоровых детей всего было выделено 1819 штаммов микроорганизмов. Видовую идентификацию

большинства штаммов проводили при помощи масс-спектрометрического метода MALDI TOF MS. Для установления таксономической принадлежности 140 штаммов бактерий, которые не удалось идентифицировать методом масс-спектрометрии, проводили секвенирование фрагмента гена 16S рПНК. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с базой данных GenBank показал, что 130 штаммов бактерий принадлежали к 88 известным видам, а 10 относились к новым, еще не изученным таксонам бактерий. Количество выявленных видов микроорганизмов на один образец варьировало от 21 до 48 и в среднем составило 34 ± 8 . Общее количество жизнеспособных бактерий на 1 г фекалий варьировало от 10,0 до $11,1 \log_{10}$ КОЕ/г и в среднем составило $10,6 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г.

В целом, было обнаружено, что выделенные штаммы принадлежали к 7 типам, 13 классам, 18 порядкам, 33 семействам, 77 родам и 149 видам домена бактерий. Также было выделено 3 вида грибов, относящихся к двум семействам порядка *Saccharomycetales*.

Снижение размерности методом главных компонент, а также использование алгоритма VAT не выявили тенденции к образованию кластеров из микробиоценозов обследуемых детей на основании полученных данных о количественном и качественном составе, что не позволяет сгруппировать микробиоценозы в этом исследовании в энтеротипы или их аналоги. Не было выявлено статистически значимых различий в микробном составе кишечной микробиоты в зависимости от возраста и пола детей, что может быть обусловлено малым размером и гомогенностью выборки.

Родовая принадлежность, частота встречаемости и количественный уровень микроорганизмов, выделенных из образцов фекалий 20 здоровых детей, представлены в табл. 1–5. Выявлено, что доминирующие по количеству и частоте встречаемости бактерии принадлежали к типам *Firmicutes* ($9,8 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г), *Bacteroidetes* ($10,3 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г), *Actinobacteria* ($10,0 \pm 0,5 \log_{10}$ КОЕ/г) и *Proteobacteria* ($8,5 \pm 1,1 \log_{10}$ КОЕ/г). Представители каждой из этих групп бактерий были обнаружены у всех детей. Кроме того, у 25% детей из испражнений были получены в среднем количестве $9,1 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г в чистой культуре бактерии вида *Akkermansia muciniphila*, относящиеся к типу *Verrucomicrobia*, и у двух детей *Fusobacterium mortiferum* ($8,8$ и $8,6 \log_{10}$ КОЕ/г), представители типа *Fusobacteria*. От одного ребенка в концентрации, составившей $10^9 \log_{10}$ КОЕ/г испражнений, был выделен штамм бактерий *Victivallis vadensis*, относящихся к типу *Lentisphaerae*.

Тип *Actinobacteria* включал в себя два класса бактерий *Actinobacteria* и *Coriobacteriia* (табл. 1). Бактерии класса *Actinobacteria* принадлежали к 4 порядкам и 4 семействам, среди которых доминировали представители семейств *Bifidobacteriaceae* и *Propionibacteriaceae*. Бифидобактерии, частота встречаемости которых составляла 100% случаев, были одними из доминирующих микроорганизмов в кишечной микрофлоре здоровых детей. Всего у детей было выделено 6 видов бифидобактерий, среди которых преобладали *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, и бифидобактерии группы *B. catenulatum/pseudocatenulatum*.

Класс *Coriobacteriia* в большей степени был представлен семействами *Coriobacteriaceae* и *Eggerthellaceae*, доминирующими видами которых были *Collinsella aerofaciens* и *Eggerthella lenta*.

Тип *Bacteroidetes* включал 5 семейств бактерий только одного порядка *Bacteroidales* (табл. 2). Семейство

Таблица 1. Видовая принадлежность культивируемых бактерий типа *Actinobacteria* кишечной микрофлоры, выделенных от здоровых детей ($n = 20$)

Тип <i>Actinobacteria</i>			
Класс <i>Actinobacteria</i>			
Название таксонов	Число обнаружений (%) ^a	$C \pm C_{\text{откл.}} \log_{10}$ КОЕ/г ^b	Питательные среды ^e
Порядок <i>Bifidobacteriales</i>, семейство <i>Bifidobacteriaceae</i>, род <i>Bifido bacterium</i>			
	20 (100)	9,8 ± 0,6	
<i>Bifidobacterium longum</i>	20 (100)	9,3 ± 0,5	SAA; ABA; CA; BA
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	8 (40)	9,5 ± 0,6	SAA; ABA; CA; BA
<i>Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum</i> ^f	11 (55)	9,1 ± 0,7	SAA; ABA; CA; BA
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	8 (40)	9,5 ± 0,6	SAA; ABA; CA; BA
<i>Bifidobacterium animalis</i>	6 (30)	9,3 ± 0,7	SAA; ABA; CA; BA
<i>Bifidobacterium breve</i>	2 (10)	9 – 10,2 ^d	SAA; ABA; BA
Порядок <i>Propionibacteriales</i>, семейство <i>Propionibacteriaceae</i>, род <i>Cutibacterium</i>			
	7 (35)	9,1 ± 0,6	
<i>Cutibacterium acnes</i>	5 (25)	8,9 ± 0,7	SAA; ABA; BA
<i>Cutibacterium granulosum</i>	2 (10)	9 – 9,8	ABA; CA
Класс <i>Coriobacteriia</i>			
Порядок <i>Coriobacteriales</i>, семейство <i>Coriobacteriaceae</i>			
<i>Collinsella aerofaciens</i>	11 (55)	9,2 ± 0,7	SAA; ABA; CA; BA
Порядок <i>Eggerthellales</i>, семейство <i>Eggerthellaceae</i>			
<i>Eggerthella lenta</i>	17 (85)	8,8 ± 0,7	SAA; ABA; CA
<i>Gordonibacter pamelae</i>	3 (15)	8,5 ± 0,9	ABA; CA; PAB
<i>Raoultibacter massiliensis</i>	1 (5)	9	CA
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	1 (5)	9,3	CA
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	1 (5)	9	CA

Примечание (в этой таблице и в табл. 2–5): ^a Частота наблюдений (абсолютное число детей в %); ^b Среднее значение ± стандартное отклонение \log_{10} числа жизнеспособных микроорганизмов в 1 г испражнений (КОЕ/г — колониобразующих единиц в 1 г испражнений); ^c/^e — группа филогенетически близких микроорганизмов, принадлежность к которой установлена методом MALDI TOF MS при помощи прибора Vitek MS Plus и программы Saranis Premium V. 4.10; ^d Меньшее и большее значение показателя \log_{10} числа жизнеспособных микроорганизмов, в случае если они были обнаружены только у двух обследованных детей в группе; ^e Названия питательных сред, которые были использованы для выделения и учета соответствующих видов микроорганизмов. SAA — Schaedler Anaerobe Agar; ABA — Anaerobe Basal Agar; CA — Columbia Agar; BA — Bifidobacterium Agar; PAB — Perfringens Agar Base; MRS — Lactobacillus MRS Agar; EA — Endo Agar; SSA — Salmonella-Shigella-Agar; GMSA — Gelatin Mannitol Salt Agar (Staphylococcus Agar # 110); mEA — mEnterococcus Agar; CAa — Columbia Agar, чашки с которым инкубировали аэробно; SC2A — Sabouraud Chloramphenicol 2 Agar.

Bacteroidaceae было представлено одним родом *Bacteroides*, к которому относилось 14 обнаруженных видов. Частота выделения бактериоидов составляла 100% случаев, а их среднее количество было равно $10,1 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г испражнений. Среди бактериоидов у здоровых детей доминировали виды *B. dorei/vulgatus* и *B. ovatus/xylanisolvans*, а также *B. uniformis*, *B. fragilis* и *B. thetaiotaomicron*.

Семейство *Rikenellaceae* также было представлено только одним родом *Alistipes*, к которому относилось 9 выделенных видов бактерий. Частота встречаемости *Alistipes* у здоровых детей составила 90% случаев. Среднее количество бактерий этого рода было равно $9,5 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г, доминировали виды *A. onderdonkii*, *A. putredinis* и *A. fingoldii*.

Бактерии, относившиеся к семейству *Porphyromonadaceae*, были выделены от 75% детей и относились к трем родам *Parabacteroides*, *Barnesiella* и *Coprobacter*. Доминирующими видами этих таксонов были *P. distasonis*, *P. merdae* и *B. intestinihominis*, обнаруженные у 45%, 35% и 40% детей соответственно. Причем почти во всех случаях, когда были обнаружены бактерии этих таксономических групп, их концентрация составляла или была близка к 10^9 КОЕ/г исследуемого материала.

Бактерии семейства *Prevotellaceae* оказались наиболее редкими представителями порядка *Bacteroidales* при использованном пороге обнаружения анаэробных бактерий, составлявшем не менее 10^8 микробных клеток на 1 г испражнений. В целом от трех детей (15%) было

выделено 5 штаммов бактерий этой группы, относящихся к видам *Prevotella copri*, *P. melaninogenica*, *P. rara* и *Paraprevotella clara*.

Тип *Firmicutes* отличался наибольшим разнообразием входящих в него таксонов и был представлен четырьмя классами бактерий, включавшими 7 порядков, 17 семейств, 45 родов и 93 вида микроорганизмов, в том числе новые таксоны бактерий, обнаруженные в этом исследовании (табл. 3). Класс *Clostridia* был представлен только порядком *Clostridiales*, к которому относились 47 видов бактерий, принадлежавших к 30 родам и 6 семействам. Представители семейства *Lachnospiraceae* обнаружены у 85% детей в средней концентрации, составившей $9,0 \pm 1,0 \log_{10}$ КОЕ/г исследуемого материала, и были наиболее часто встречающимся таксоном это класса. Среди видов бактерий, входивших в это семейство и обнаруживаемых чаще других, были *Clostridium clostridioforme*, определявшиеся у 55% детей в средней концентрации, равной $8,2 \pm 1,0 \log_{10}$ КОЕ/г. Другими часто встречающимися родами семейства *Lachnospiraceae* были *Blautia* (у 65% детей в средней концентрации $8,9 \pm 0,9 \log_{10}$ КОЕ/г), а также бактерии рода *Anaerostipes* (у 40% детей в концентрации $8,2 \pm 1,0 \log_{10}$ КОЕ/г). Еще одним часто встречающимся семейством бактерий класса *Clostridia* были представители *Ruminococcaceae* (у 65% детей в средней концентрации $8,8 \pm 0,5 \log_{10}$ КОЕ/г) и в большей степени представленные бактериями видов *Flavonifractor plautii*, *Ruthenibacterium lactatiformans*

Таблица 2. Видовая принадлежность культивируемых бактерий типа *Firmicutes* кишечной микрофлоры, выделенных от здоровых детей ($n = 20$)

Тип <i>Firmicutes</i>			
Название таксонов	Число обнаружений (%)	$C \pm C_{\text{откл.}}$ \log_{10} КОЕ/г	Питательные среды
Класс <i>Erysipelotrichia</i>, порядок <i>Erysipelotrichales</i>			
Семейство <i>Erysipelotrichaceae</i>	11 (55)	8,5 ± 1,0	
Род <i>Erysipelatoclostridium</i>	11 (55)	8,4 ± 0,9	
<i>Clostridium ramosum</i>	8 (40)	8,2 ± 0,9	SAA; ABA; CA; PAB
<i>Clostridium innocuum</i>	8 (40)	8,1 ± 0,43	SAA; ABA; CA; PAB
<i>Clostridium saccharogumia</i>	1 (5)	8,7	ABA
<i>Clostridium spiroforme</i>	1 (5)	9	SAA
<i>Holdemanella biformis</i>	1 (5)	9,4	SAA
<i>Dielma fastidiosa</i>	1 (5)	8	SAA; ABA; CA
<i>Coprobacillus cateniformis</i>	1 (5)	9	ABA
<i>Absiella dolichum</i>	1 (5)	8	CA
<i>Turicibacter sanguinis</i>	1 (5)	8	SAA
Класс <i>Clostridia</i>, порядок <i>Clostridiales</i>			
Семейство <i>Clostridiaceae</i>	10 (50)	8,5 ± 1,1	
Род <i>Clostridium</i>	4 (20)	8,1 ± 1,4	
<i>Clostridium perfringens</i>	3 (15)	8,5 ± 0,7	SAA; CA; PAB
<i>Clostridium paraputrificum</i>	2 (10)	6,3 – 9,4	SAA; ABA; PAB
<i>Clostridium ventriculi</i>	1 (5)	10,4	ABA
<i>Clostridium barattii</i>	1 (5)	6	PAB
<i>Hungatella hathewayi</i>	7 (35)	7,8 ± 0,8	SAA; PAB
<i>Mordavella sp.</i>	1 (5)	9	ABA
<i>Lactonifactor sp. ASD3451</i>	1 (5)	8	PAB
Семейство <i>Lachnospiraceae</i>	17 (85)	9,0 ± 1,0	
Род <i>Lachnoclostridium</i>	13 (65)	8,4 ± 1,0	
<i>Clostridium clostridioforme</i>	11 (55)	8,2 ± 1,0	SAA; ABA; PAB
<i>Clostridium scindens</i>	3 (15)	8,0 ± 0,0	SAA; PAB
<i>Clostridium symbiosum</i>	2 (10)	6,0 – 8,0	SAA; PAB
<i>Lachnoclostridium sp. ASD2032</i>	1 (5)	9	SAA
<i>Clostridium lavalense</i>	1 (5)	6	PAB
<i>Clostridium hylemonae</i>	1 (5)	9	SAA
<i>Lachnoclostridium sp. ASD3950</i>	1 (5)	9,3	ABA
<i>Anaerostipes sp.</i>	8 (40)	8,2 ± 1,0	SAA; ABA; CA
<i>Eisenbergiella tayi</i>	2 (10)	8,0 – 9,0	ABA; CA
Род <i>Blautia</i>	13/65	8,9 ± 0,9	
<i>Blautia torques</i>	7 (35)	8,8 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Blautia coccoides</i>	6 (30)	7,5 ± 0,8	ABA; PAB
<i>Blautia gnavus</i>	6 (30)	8,7 ± 0,6	SAA; ABA; CA
<i>Blautia luti</i>	5 (25)	8,5 ± 0,7	SAA; ABA
<i>Blautia faecis</i>	5 (25)	8,6 ± 0,6	SAA; CA
<i>Blautia obeum</i>	3 (15)	8,5 ± 0,5	SAA; ABA
<i>Blautia wexlerae</i>	2 (10)	8,0 – 9,0	ABA; PAB
<i>Blautia sp. ASD2945</i>	1 (5)	8	ABA
<i>Blautia caecimuris</i>	1 (5)	9,6	ABA; CA
Семейство <i>Ruminococcaceae</i>	13/65	8,8 ± 0,5	
<i>Flavonifractor plautii</i>	7 (35)	8,7 ± 0,5	SAA; ABA; PAB
<i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>	5 (25)	8,5 ± 0,5	ABA; CA
<i>Anaerotruncus collihominis</i>	4 (20)	8,3 ± 0,5	ABA; PAB
<i>Flavonifractor sp. ASD20665</i>	1 (5)	7,3	PAB
<i>Monoglobus pectinilyticus</i>	1 (5)	8,3	SAA
<i>Ruminiclostridium leptum</i>	1 (5)	8	ABA

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1 (5)	8,3	ABA
<i>Gemmiger formicilis</i>	1 (5)	8	ABA
<i>Agathobaculum</i> sp. ASD2948	1 (5)	8	ABA
<i>Ruminococcaceae</i> ASD2818	1 (5)	8	SAA
Род Dorea	4 (20)	8,6 ± 0,6	
<i>Dorea longicatena</i>	3 (15)	8,2 ± 0,3	SAA; ABA; PAB
<i>Dorea formicirans</i>	1 (5)	8	PAB
<i>Dorea</i> sp.	1 (5)	9,3	ABA
<i>Sellimonas intestinalis</i>	7 (35)	8,8 ± 0,5	SAA; ABA;
<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	3 (15)	8,4 ± 0,5	ABA; CA
<i>Coprococcus comes</i>	1 (5)	8,8	ABA
Семейство Eubacteriaceae	4 (20)	7,8 ± 0,39	ABA; PAB
<i>Eubacterium limosum</i>			
Семейство Christensenellaceae	1 (5)	9	CA
<i>Christensenella minuta</i>			
Семейство Peptostreptococcaceae			
<i>Terrisporobacter</i> sp.	1 (5)	8	PAB
<i>Paeniclostridium sordellii</i>	1 (5)	9	SAA
Рода с неопределенным таксономическим положением			
<i>Intestinimonas</i> sp.	1 (5)	9	ABA
<i>Lawsonibacter asaccharolyticus</i>	1 (5)	9	CA
Класс Bacilli			
Порядок Lactobacillales			
Семейство Lactobacillaceae			
Род Lactobacillus	13/65	6,3 ± 1,6	
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	6 (30)	6,3 ± 1,9	MRS
<i>Lactobacillus gasseri/acidophilus</i>	5 (20)	7,0 ± 1,2	MRS
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3 (15)	4,5 ± 0,2	MRS
<i>Lactobacillus salivarius/delbruekii</i>	2 (10)	5,5 – 6,3	MRS
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1 (5)	4	MRS
<i>Lactobacillus brevis</i>	1 (5)	4	MRS
Семейство Leuconostocaceae	1 (5)	6,3	MRS
<i>Leuconostoc lactis</i>			
Семейство Enterococcaceae			
Род Enterococcus	16/80	6,1 ± 1,3	
<i>Enterococcus faecalis</i>	8 (40)	5,8 ± 1,0	mEA
<i>Enterococcus faecium</i>	9 (45)	4,9 ± 0,7	mEA
<i>Enterococcus durans</i>	3 (15)	4,3; 4,8; 9,5	mEA
<i>Enterococcus avium/raffinosis</i>	7 (35)	6,5 ± 0,8	mEA
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1 (5)	6	mEA
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1 (5)	4	mEA
Семейство Streptococcaceae			
Род Streptococcus	19/95	7,5 ± 1,2	
<i>Streptococcus salivarius</i>	17/85	6,9 ± 1,2	mEA, MRS
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	9 (45)	6,6 ± 1,0	mEA, MRS
<i>Streptococcus oralis/pneumoniae/mitis</i>	5 (45)	7,1 ± 2,6	mEA, MRS
<i>Streptococcus anginosus</i>	2 (10)	5,0 – 5,7	mEA, MRS
<i>Streptococcus mutans</i>	2 (10)	6,1 – 6,3	mEA, MRS
<i>Streptococcus constellatus</i>	1 (5)	6	MRS
<i>Streptococcus infantarius</i>	1 (5)	8,4	MRS
<i>Streptococcus disgalactiae</i>	1 (5)	8,9	CA
Род Lactococcus	1 (5)	6,1	MRS
<i>Lactococcus lactis</i>			

Семейство <i>Aerococcaceae</i>	1 (5)	6	SAA
<i>Aerococcus viridans</i>			
Порядок <i>Bacillales</i>			
Семейство <i>Staphylococcaceae</i>	18/90	5,0 ± 1,7	
<i>Staphylococcus aureus</i>	14/70	3,9 ± 0,8	GMSA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6 (30)	4,3 ± 1,4	GMSA
<i>Staphylococcus hominis</i>	3 (15)	4,6 ± 0,8	GMSA
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3 (15)	2,5 – 5,2	GMSA
<i>Staphylococcus sacharolyticus</i>	2 (10)	9	ABA
<i>Staphylococcus warneri</i>	2 (10)	5,2 – 8,8	GMSA; CA
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (5)	4,3	GMSA
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	1 (5)	3,2	GMSA
Семейство <i>Bacillaceae</i>	6 (30)	3,4 ± 0,3	GMSA
<i>Bacillus sp.</i>			
Класс <i>Negativicutes</i>			
Порядок <i>Veillonellales</i>	12 (60)	8,8 ± 0,9	
Семейство <i>Veillonellaceae</i>			
<i>Veillonella sp.</i>	7 (35)	8,0 ± 0,9	SAA; ABA; CA
<i>Allisonella histaminiformans</i>	1 (5)	8	ABA
Род <i>Dialister</i>	9 (45)	9,0 ± 0,5	
<i>Dialister invisus</i>	8 (40)	9,1 ± 0,4	SAA; ABA
<i>Dialister succinatiphilus</i>	1 (5)	8	CA
Порядок <i>Selenomonadales</i> , семейство <i>Selenomonadaceae</i>			
<i>Megamonas sp.</i>	2 (10)	8,8 – 9,0	ABA; CA
Порядок <i>Acidaminococcales</i> , семейство <i>Acidaminococcaceae</i>			
<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	8 (40)	9,0 ± 0,4	SAA; ABA; CA
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	1 (5)	8	SAA

и *Anaerotruncus colihominis*. Стоит отметить, что бактерии таких видов семейства *Ruminococcaceae*, как *Faecalibacterium prausnitzii* и *Gemmiger formicilis*, которые по результатам секвенирования библиотек генов 16S рРНК составляют доминирующую часть нормальной микрофлоры кишечника человека [16], были выделены нами только от одного ребенка. Этот результат скорее указывает на необходимость использования для их выделения специальных питательных сред и технологий культивирования, максимально исключающих контакт исследуемого материала и сред с посевами с кислородом воздуха, ввиду чрезвычайно высокой чувствительности к нему бактерий этих таксонов.

Еще одним часто определявшимся таксоном бактерий типа *Firmicutes* были представители семейства *Erysipelotrichaceae* (класс *Erysipelotrichia*, порядок *Erysipelotrichales*), которые были обнаружены у 55% здоровых детей в средней концентрации, составившей $8,5 \pm 1,0 \log_{10}$ КОЕ/г исследуемого материала. Среди 6 родов и 9 видов бактерий этого семейства доминировали *Clostridium innocuum* и *Clostridium ramosum* — их выявляли с частотой, равной 40% в концентрации, превышавшей 10^8 КОЕ/г исследуемого материала.

Бактерии, относящиеся к классу *Negativicutes*, были обнаружены у 100% детей в средней концентрации, равной $8,9 \pm 0,7 \log_{10}$ КОЕ/г исследуемого материала. Доминирующими таксонами этой группы были представители семейств *Veillonellaceae*, к которым относились бактерии родов *Veillonella* и *Dialister* (у 35% и 45% детей соответственно), а также семейства *Acidaminococcaceae*, в основном

представленное бактериями вида *Phascolarctobacterium faecium*, высеванными в высокой концентрации из фекалий 40% детей.

Из бактерий толстой кишки, относящихся к типу *Proteobacteria*, выявлены представители классов *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* (табл. 4). Класс *Betaproteobacteria* включал различные виды бактерий из семейства *Sutterellaceae* (выделены у 60% детей в средней концентрации $8,8 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г исследуемого материала). Класс *Deltaproteobacteria* в основном был представлен образующими сероводород бактериями вида *Bilophila wadsworthia* (выделены из фекалий 55% детей в средней концентрации $8,0 \pm 0,8 \log_{10}$ КОЕ/г исследуемого материала). Наконец, класс *Gammaproteobacteria* был представлен только бактериями из родов, входящих в семейство *Enterobacteriaceae*, при этом *Escherichia coli* были обнаружены у 100% детей в средней концентрации $7,2 \pm 0,4 \log_{10}$ КОЕ/г исследуемого материала. Другими относительно часто высеваемыми представителями семейства были бактерии видов *Enterobacter cloacae* (30%), *Citrobacter freundii* (20%) и *Klebsiella pneumoniae* (20%) в концентрациях, обычно не превышавших 10^6 КОЕ/г исследуемого материала.

Грибы были обнаружены у 45% здоровых детей в количестве $3,4 \pm 1,4 \log_{10}$ КОЕ/г исследуемого материала, причем все выделенные штаммы принадлежали к порядку *Saccharomycetales* (табл. 5). В испражнениях 35% детей были определены грибы рода *Candida* семейства *Debaryomycetaceae*, относившиеся в основном к виду *C. albicans*. Кроме этого, у двух детей были обнаружены

Таблица 3. Видовая принадлежность культивируемых бактерий типа *Bacteroidetes* кишечной микрофлоры, выделенных от здоровых детей ($n = 20$)

Тип <i>Bacteroidetes</i> , класс <i>Bacteroidia</i> , порядок <i>Bacteroidales</i>			
Название таксонов	Число обнаружений (%)	$C \pm C_{\text{откл.}} \log_{10}$ КОЕ/г	Питательные среды
Семейство <i>Bacteroidaceae</i>	20 (100)	10,1 ± 0,4	
<i>Bacteroides dorei/vulgatus</i>	19 (95)	9,5 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides ovatus/xylanisolvans</i>	16 (80)	9,2 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides uniformis</i>	17 (85)	9,4 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides fragilis</i>	9 (45)	9,1 ± 0,6	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	9 (45)	9,1 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides caccae</i>	8 (40)	9,0 ± 0,7	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides eggertii</i>	6 (30)	9,2 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides stercoris</i>	4 (20)	9,0 ± 0,2	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides intestinalis</i>	3 (15)	9,2 ± 0,3	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides clarus</i>	2 (10)	9,0 – 10,3	ABA
<i>Bacteroides massiliensis</i>	2 (10)	9,3 – 9,5	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides plebeius</i>	1 (5)	9,6	SAA; ABA; CA
<i>Bacteroides coprocola</i>	1 (5)	8	ABA
<i>Bacteroides salyersiae</i>	1 (5)	8	CA
<i>Bacteroides sp. ASD2038</i>	1 (5)	9,7	SAA
Семейство <i>Rikenellaceae</i>	18/90	9,5 ± 0,4	
<i>Alistipes onderdonkii</i>	11 (55)	9,1 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Alistipes putredinis</i>	10 (50)	9,5 ± 0,5	SAA; ABA; CA
<i>Alistipes finigoldii</i>	8 (40)	8,8 ± 0,7	SAA; ABA; CA
<i>Alistipes shachii</i>	5 (25)	9,2 ± 0,3	SAA; ABA; CA
<i>Alistipes indistinctus</i>	2 (10)	8,0 – 9,0	CA
<i>Alistipes obessii</i>	3 (15)	9,1 ± 0,2	ABA
<i>Alistipes inops</i>	3 (15)	8,8 ± 0,7	SAA; ABA
<i>Alistipes massiliensis</i>	1 (5)	8,8	ABA; CA
<i>Alistipes ihumii</i>	1 (5)	9,4	SAA; ABA
Семейство <i>Porphyromonadaceae</i>	15 (75)	9,4 ± 0,5	
Род <i>Parabacteroides</i>	13 (65)	9,2 ± 0,7	
<i>Parabacteroides distasonis</i>	9 (45)	9,1 ± 0,8	SAA; ABA; CA
<i>Parabacteroides merdae</i>	7 (35)	8,9 ± 0,7	SAA; ABA; CA
<i>Parabacteroides sp. ASD2049</i>	1 (5)	9	SAA
<i>Barnesiella intestinihominis</i>	8 (40)	9,2 ± 0,3	SAA; ABA; CA
<i>Coprobacter fastidiosus</i>	3 (15)	9,1 ± 0,1	SAA; ABA; CA
Семейство <i>Odoribacteraceae</i>	8 (40)	9,3 ± 0,3	
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	5 (25)	9,3 ± 0,3	SAA; ABA; CA
<i>Butyricimonas sp.</i>	4 (20)	9,3 ± 0,4	ABA; CA
Семейство <i>Prevotellaceae</i>	3 (15)	8,8 ± 0,9	
<i>Prevotella copri</i>	2 (10)	8,5 – 9,0	SAA; ABA; CA
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1 (5)	8	ABA
<i>Prevotella rara</i>	1 (5)	9	ABA; CA
<i>Paraprevotella clara</i>	1 (5)	9,6	ABA; CA

грибы, принадлежавшие виду *Clavispora lusitaniae* семейства *Metschnikowiaceae*.

Таксономические свойства 10 штаммов бактерий, которые были выделены при выполнении этих исследований и видовую принадлежность которых установить не удалось, представлены в табл. 6. Большинство (7 из 10 штаммов) принадлежали к типу *Firmicutes*. Четыре из них имели филогенетическую связь с видами из родов *Blautia*, *Flintibacter* и *Lachnoclostridium* из семейства

Lachnospiraceae. Два клона были близки к разным видам из семейства *Ruminococcaceae*, и еще один клон был филогенетически сходен с представителями рода *Lactonifactor* из семейства *Clostridiaceae*. Кроме того, один клон нового таксона бактерий был связан с типовым штаммом, принадлежащим семейству *Sutterellaceae*, относящемуся к типу *Proteobacteria*, и по одному клону принадлежали к родам *Parabacteroides* и *Bacteroides* (семейства *Porphyromonadaceae* и *Bacteroidaceae* соответственно, тип *Bacteroidetes*).

Таблица 4. Видовая принадлежность культивируемых бактерий типа *Proteobacteria* кишечной микрофлоры, выделенных от здоровых детей ($n = 20$)

Тип <i>Proteobacteria</i>			
Класс <i>Gammaproteobacteria</i>			
Название таксонов	Число обнаружений (%)	C ± СОткл. log ₁₀ КОЕ/г	Питательные среды
Порядок <i>Enterobacteriales</i> , семейство <i>Enterobacteriaceae</i>			
<i>Escherichia coli</i>	20 (100)	7,2 ± 1,4	EA; CAa
<i>Enterobacter cloacae</i>	6 (30)	6,0 ± 1,5	EA; SSA; CAa
<i>Citrobacter freundii</i>	4 (20)	5,8 ± 0,68	EA; SSA; CAa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (20)	6,5 ± 1,7	EA; CAa
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1 (5)	6,5	CAa
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (5)	6	SSA; CAa
Класс <i>Betaproteobacteria</i> , порядок <i>Burkholderiales</i>			
Семейство <i>Sutterellaceae</i>			
<i>Parasutterella excrementihominis</i>	4 (20)	8,6 ± 0,4	ABA; CA
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	5 (25)	8,9 ± 0,1	ABA
<i>Sutterella massiliensis</i>	1 (5)	9,5	CA
<i>Sutterella sp. ASD3426</i>	1 (5)	8	CA
<i>Duodenibacillus massiliensis</i>	1 (5)	9,1	SAA
Семейство <i>Oxalobacteraceae</i>			
<i>Massilia timonae</i>	1 (5)	8	CA
Класс <i>Deltaproteobacteria</i>			
Порядок <i>Desulfovibrionales</i> , семейство <i>Desulfovibrionaceae</i>			
<i>Bilophila wadsworthia</i>	11 (55)	8,0 ± 0,8	SAA; CA; PAB
<i>Desulfovibrio piger</i>	1 (5)	8,1	PAB

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выбор возрастной группы для исследования был обусловлен тем, что качественные и количественные параметры состава микрофлоры кишечника у детей приближаются к значениям, характерным для взрослых людей, приблизительно к трехлетнему возрасту [17]. К этому возрасту кишечная микрофлора приобретает относительную композиционную стабильность, трактуемую как характерная для отдельного индивидуума устойчивость к изменению относительной численности видов с течением времени [18].

Основные проблемы, возникающие при использовании культуральных методов в исследованиях микробиоты кишечника, связаны с подбором питательных сред, которые должны поддерживать рост требовательных строго анаэробных бактерий, и необходимостью проведения видовой идентификации многочисленных штаммов микроорганизмов, растущих на этих средах. В работе мы использовали известные питательные среды, хорошо зарекомендовавшие себя в том числе для целей выделения строго анаэробных бактерий микрофлоры кишечника. В частности, для выделения строго анаэробных бактерий мы использовали 5 различных питательных сред, разлитых в чашки Петри, которые после посева инкубировали при 37 °C в микроанаэростатах в анаэробной газовой среде.

Ранее было показано, что увеличение количества используемых питательных сред и количества обследуемых субъектов ведет к увеличению числа выделяемых видов бактерий, что говорит о значительных межиндивидуальных различиях в составе кишечной микробиоты у человека [3]. Это подтверждают и результаты метагеномного секвенирования, выявившие очень высокую изменчивость численности (в 12–2200 раз) для 57 наиболее распространенных видов микроорганизмов у

людей [19]. В нашем исследовании, несмотря на то что от каждого конкретного ребенка было выделено в среднем 34 ± 8 видов микроорганизмов, в целом у всех детей было обнаружено 159 видов бактерий, включая новые таксоны.

Наибольшее видовое разнообразие (более 90 видов бактерий) нами было обнаружено в составе типа *Firmicutes*, причем более половины из них принадлежали к классу *Clostridia* порядка *Clostridiales*. Доминирующими по частоте встречаемости и по количественному содержанию семействами этого класса были *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*. Полученные нами данные, характеризующие состав этой части микробиоты у детей в России, хорошо согласуются с результатами ранее проведенных исследований, в которых как культуральными методами, так и посредством анализа нуклеотидных последовательностей библиотек генов 16S рДНК было установлено доминирование этих таксонов в образцах кишечной микробиоты человека [6, 20].

Среди выделенных нами в чистой культуре из испражнений здоровых детей представителей кишечных эндосимбионтов, относящихся в частности к классам *Erysipelotrichia* и *Clostridia*, также присутствовали бактерии, для которых была установлена связь с различными инфекционными заболеваниями, поэтому совершенствование методов культивирования и видовой идентификации бактерий этих таксонов имеет не только экологическое, но и клиническое значение. Например, *Clostridium innocuum* часто ассоциированы с бактериемиями у пациентов с иммунодефицитными состояниями и отличаются устойчивостью к антибактериальным препаратам, используемым для купирования анаэробных инфекций. *C. ramosum*, которые также были выделены нами, считают вторыми наиболее часто встречающимися бактериями из группы клостридий после *C. perfringens*, обнаруживаемыми

Таблица 5. Видовая принадлежность грибов порядка *Saccharomycetales* кишечной микрофлоры, выделенных от здоровых детей ($n = 20$)

Название таксонов грибов	Число обнаружений (%)	$C \pm C_{откл.} \log_{10}$ КОЕ/г	Питательные среды
Порядок <i>Saccharomycetales</i>	9 (45)	$3,4 \pm 1,4$	
Семейство <i>Debaryomycetaceae</i>	7 (35)	$3,5 \pm 1,4$	
<i>Candida albicans</i>	5 (25)	$3,7 \pm 1,4$	SC2A
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (5)	2,5	SC2A
<i>Candida sp.</i>	1 (5)	2,5	SC2A
Семейство <i>Metschnikowiaceae</i>	2 (10)	2,0 – 5,0	SC2A
<i>Clavispora lusitaniae</i>			

Таблица 6. Новые филотипы кишечных бактерий, выделенные от здоровых детей, и значения уровней гомологии нуклеотидной последовательности их 16S рДНК с той же последовательностью типовых штаммов ближайших валидированных в соответствии с правилами International Code of Nomenclature of Bacteria (Bacteriological Code) видов.

№	Номер штамма	Тип/семейство	№ сиквенса в Genbank	Ближайшие штаммы с высокосходными последовательностями при быстром сравнении (Megablast) в GenBank	Гомология (%)
1	ASD 3426	<i>Proteobacteria Sutterellaceae</i>	MK615133.1	<i>Sutterella wadsworthensis</i> WAL9799	97,93
2	ASD2049	<i>Bacteroidetes Porphyromonadaceae</i>	MG321612.1	<i>Parabacteroides merdae</i> JCM9497	96,63
3	ASD2038	<i>Bacteroidetes Bacteroidaceae</i>	MK615124.1	<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	98,19
4	ASD2032	<i>Firmicutes Lachnospiraceae</i>	MK615123.1	[Clostridium] <i>amygdalinum</i> BR-10	95,72
5	ASD2945	<i>Firmicutes Lachnospiraceae</i>	MK615128.1	<i>Blautia faecis</i> KB1	96,03
6	ASD3950	<i>Firmicutes Lachnospiraceae</i>	MK615131.1	[Clostridium] <i>glycyrrhizinilyticum</i> ZM35	95,73
7	ASD3451	<i>Firmicutes Clostridiaceae</i>	MK615130.1	<i>Lactonifactor longoviformis</i> ED-Mt61/PYG-s6	94,61
8	ASD20665	<i>Firmicutes Ruminococcaceae</i>	MK615126.1	<i>Flintibacter butyricus</i> BLS21	97,33
9	ASD2818	<i>Firmicutes Ruminococcaceae</i>	MH043116.1	<i>Caproiciproducens galactitolivorans</i> BS-1	93,76
10	ASD2948	<i>Firmicutes Ruminococcaceae</i>	MK615129.1	<i>Agathobaculum desmolans</i> ATCC43058	97,01

в клиническом материале от детей с абсцессами, перитонитами, бактериемиями и хроническими средними отитами, и третьим наиболее часто встречающимся видом клостридий при бактериемиях у взрослых [21, 22].

Тип *Bacteroidetes* составил вторую группу по количеству выявленных таксонов после *Firmicutes* и был представлен 33 видами бактерий, относящихся, однако, только к одному порядку *Bacteroidales*.

Известно, что *Bacteroidales* включает в себя основную часть анаэробных неспорообразующих грамотрицательных палочковидных бактерий, колонизирующих желудочно-кишечный тракт человека [23]. Мы обнаружили, что у детей младшего возраста в кишечной микрофлоре доминировали представители семейств *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae* и *Porphyromonadaceae*, которые были выделены из фекалий 100%, 90% и 75% детей соответственно. В более ранней работе для оценки состава доминирующих групп кишечных бактерий из порядка *Bacteroidales* у детей в возрасте 6 лет мы проводили высеив серийных разведений испражнений только на Columbia Agar с добавлением бараньей крови с последующим определением видовой принадлежности выросших анаэробных грамотрицательных палочковидных бактерий при помощи комбинации методов, включающей и рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов гена 16S рПНК (ARDRA), а также их секвенирование. В этом исследовании из фекалий 8 детей нами было выделено всего 38 штаммов бактерий, принадлежавших

к 13 видам *Bacteroidales* [12]. В настоящем исследовании для выявления той же группы бактерий мы использовали 3 различные питательные среды с предварительной идентификацией всех выросших бактерий при помощи методов масс-спектрометрии и дополнительным секвенированием гена 16S рДНК, выполненным для штаммов с неясным таксономическим положением. Этот подход позволил нам кроме бактерий, относящихся к другим таксономическим группам, выделить 33 вида бактерий, относящихся к 9 родам и 5 семействам порядка *Bacteroidales*.

Представители семейства *Prevotellaceae*, также относящегося к порядку *Bacteroidales*, среди доминирующих групп бактерий были обнаружены нами только у троих детей (15%). Несмотря на то что к настоящему времени известно около 30 видов превотелл, колонизирующих в основном ротовую полость человека, до недавнего времени в качестве комменсалов кишечника рассматривали только два вида бактерий этого рода — *P. copri* и *P. stercorea*. В нашей работе, кроме *P. copri* и редко изолируемых из кишечника *P. melaninogenica*, впервые от ребенка были выделены превотеллы недавно описанного нового вида *P. rara* [24].

В качестве доминирующих групп кишечных бактерий превотеллы преимущественно определяют у людей, в диете которых существенно преобладают продукты растительного происхождения, что связывают со

способностью этих бактерий расщеплять растительные полисахариды в дистальных отделах кишечного тракта [20]. Вместе с тем, преобладание в кишечной микробиоте бактерий рода *Bacteroides* и представителей порядка *Clostridiales*, которое было зарегистрировано и в нашей работе, ранее было ассоциировано с использованием смешанной диеты, характеризующейся включением в пищевой рацион наряду с растительными продуктами продуктов животного происхождения и легко усваиваемых углеводов [25, 26].

ВЫВОДЫ

Использованный нами подход, основанный на применении широкого спектра питательных сред для выделения трудно культивируемых групп кишечных эндосимбионтов как в аэробных, так и в анаэробных условиях, с последующей видовой идентификацией бактерий с помощью масс-спектрометрического метода и метода секвенирования гена 16S rPHK, позволил провести анализ качественного и количественного состава доминирующих культивируемых групп микроорганизмов кишечной микрофлоры у детей. В целом полученные путем использования культурального метода результаты о таксономическом составе фекальной микрофлоры детей не противоречат данным, получаемым при использовании молекулярных методов, основанных на секвенировании бактериальных ДНК. Кроме того, нами были выделены в чистой культуре многочисленные штаммы трудно культивируемых бактерий и 10 штаммов

новых бактерий с еще не изученными биологическими свойствами. Полученные данные позволяют расширить представления о спектре культивируемых таксономических групп кишечных бактерий и об их количественном содержании у детей. Выделенные нами штаммы как известных, так и новых таксонов могут быть использованы для изучения широкого репертуара их свойств, в том числе биотерапевтического потенциала в целях создания на их основе новых пробиотических лекарственных препаратов. В то же время многие известные таксоны кишечных эндосимбионтов, включая представителей таких доминирующих родов, как *Faecalibacterium* и *Roseburia*, нам выделить не удалось, что указывает на необходимость использования в таких исследованиях более совершенных анаэробных технологий, в частности анаэробных камер на этапах пробоподготовки, посева и учета выросших культур. Сложность и трудоемкость развернутого культурального метода для оценки многокомпонентной кишечной микробиоты не позволяют рекомендовать его для широкого применения в клинической практике, даже если предположить, что в будущем удастся полностью автоматизировать все этапы исследования. Однако отработка методов выделения в чистой культуре и идентификации строго анаэробных кишечных бактерий необходима, так как эти бактерии могут обладать патобиотическим потенциалом и встречаться в клиническом материале (раневое отделяемое, биоптаты, кровь, ликвор и др.), в котором обычное количественное содержание видов бактерий не столь велико.

Литература

- Maihe M, Ricaboni D, Vitton V, Gonzalez JM, Bachar D, Dubourg G, et al. Repertoire of the gut microbiota from stomach to colon using culturomics and next-generation sequencing. *BMC Microbiol.* 2018; (18): 157.
- Atanu A, Mojibur RK. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2019; (76): 473–93.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol.* 2002; 46 (8): 535–48.
- Lagier J-C, Khelaifa S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology.* 2016; (1): 16203.
- Shkoporov AN, Hill C. Bacteriophages of the Human Gut: The "Known Unknown" of the Microbiome. *Cell Host Microbe.* 2019; 25 (2): 195–209.
- Vandeputte D, Kathagen G, D'hoek K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature.* 2017; (551): 507–11.
- Tanoue T, Morita S, Plichta DR. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature.* 2019; (565): 600–05.
- Шкопоров А. Н., Ефимов Б. А., Хохлова Е. В., Черная З. А., Постникова Е. А., Белкова М. Д. Влияние приема пробиотических бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на состав микрофлоры кишечника у здоровых людей. *Техника и технология пищевых производств.* 2014; (1): 126–30.
- Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol.* 2018; (1): 540–50.
- Rychert J, Burnham CA, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, et al. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (7): 2225–31.
- McMullen AR, Wallace MA, Pincus DH, Wilkey K, Burnham CA. Evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of clinically relevant filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 2016; (54): 2068–73.
- Shkoporov AN, Khokhlova EV, Kulagina EV, Smeianov VV, Kafarskaia LI, Efimov BA. Application of several molecular techniques to study numerically predominant *Bifidobacterium* spp. and *Bacteroidales* order strains in the feces of healthy children. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72 (3): 742–8.
- Чаплин А. В., Бржозовский А. Г., Парфёнова Т. В., Кафарская Л. И., Володин Н. Н., Шкопоров А. Н. и др. Изучение видовой разнообразия бактерий рода *Bifidobacterium* кишечной микрофлоры с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии. *Вестник ПАМН.* 2015; 70 (4): 435–40.
- Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today.* 2006; (8): 6–9.
- Bezdek JC, Hathaway RJ. VAT: A Tool for Visual Assessment of Cluster Tendency. In: *Proceedings of the 2002 International Joint Conference Neural Networks.* 2002; (3): 2225–30.
- Fitzgerald CB, Shkoporov AN, Sutton TDS, Chaplin AV, Velayudhan V, Ross RP, et al. Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics.* 2018; 19 (1): 931.
- Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012; 486 (7402): 222–7.
- De Meij TGJ, Budding AE, De Groot EFJ, Jansen FM, Kneepkens CMF, Benninga MA, et al. Composition and stability of intestinal microbiota of healthy children within a Dutch population. *FASEB J.* 2016; 30 (4): 1512–22.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. MetaHIT Consortium A human gut microbial gene catalogue

- established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; (464): 59–65.
20. Browne HP, Forster SC, Anonye BO. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 2016; 533 (7604): 543–6.
 21. Brook I. Clostridial Infections in Children: Spectrum and Management. *Curr Infect Dis Rep*. 2015; (17): 47.
 22. Chia JH, Feng Y, Su LH, Wu TL, Chen CL, Liang Y-H, et al. Clostridium innocuum is a significant vancomycin-resistant pathogen for extraintestinal clostridial infection *Clinical Microbiology and Infection*. 2017; (23): 560–6.
 23. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486 (7402): 207–14.
 24. Efimov BA, Chaplin AV, Shcherbakova VA, Suzina NE, Podoprigrora IV, Shkoporov AN. *Prevotella rara* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68 (12): 3818–25.
 25. Shankar V, Gouda M, Moncivaiz J, Gordon A, Reo NV, Hussein L, et al. Differences in Gut Metabolites and Microbial Composition and Functions between Egyptian and U.S. Children Are Consistent with Their Diets. *mSystems*. 2017; 2 (1): e00169–16.
 26. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473 (7346): 174–80.

References

1. Mailhe M, Ricaboni D, Vitton V, Gonzalez JM, Bachar D, Dubourg G, et al. Repertoire of the gut microbiota from stomach to colon using culturomics and next-generation sequencing. *BMC Microbiol*. 2018; (18): 157.
2. Atanu A, Mojibur RK. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; (76): 473–93.
3. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol*. 2002; 46 (8): 535–48.
4. Lagier J-C, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology*. 2016; (1): 16203.
5. Shkoporov AN, Hill C. Bacteriophages of the Human Gut: The "Known Unknown" of the Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2019; 25 (2): 195–209.
6. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoel K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*. 2017; (551): 507–11.
7. Tanoue T, Morita S, Plichta DR. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 2019; (565): 600–05.
8. Shkoporov AN, Efimov BA, Khokhlova EV, Chernaia ZA, Postnikova EA, Belkova MD. Effect of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cultures on intestinal microbiota composition in healthy adults. *Tekhnika i Tekhnologiya Pishchevykh Proizvodstv*. 2014; (1): 126–30. Russian.
9. Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*. 2018; (1): 540–50.
10. Rychert J, Burnham CA, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, et al. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (7): 2225–31.
11. McMullen AR, Wallace MA, Pincus DH, Wilkey K, Burnham CA. Evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of clinically relevant filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 2016; (54): 2068–73.
12. Shkoporov AN, Khokhlova EV, Kulagina EV, Smeianov VV, Kafarskaia LI, Efimov BA. Application of several molecular techniques to study numerically predominant *Bifidobacterium* spp. and *Bacteroidales* order strains in the feces of healthy children. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72 (3): 742–8.
13. Chaplin AV, Brzhozovskii AG, Parfenova TV, Kafarskaia LI, Volodin NN, Shkoporov AN, et al. Species Diversity of *Bifidobacteria* in the Intestinal Microbiota Studied Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2015; 70 (4): 435–40. Russian.
14. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*. 2006; (8): 6–9.
15. Bezdek JC, Hathaway RJ. VAT: A Tool for Visual Assessment of Cluster Tendency. In: *Proceedings of the 2002 International Joint Conference Neural Networks*. 2002; (3): 2225–30.
16. Fitzgerald CB, Shkoporov AN, Sutton TDS, Chaplin AV, Velayudhan V, Ross RP, et al. Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics*. 2018; 19 (1): 931.
17. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486 (7402): 222–7.
18. De Meij TGJ, Budding AE, De Groot EFJ, Jansen FM, Kneepkens CMF, Benninga MA, et al. Composition and stability of intestinal microbiota of healthy children within a Dutch population. *FASEB J*. 2016; 30 (4): 1512–22.
19. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. MetaHIT Consortium A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; (464): 59–65.
20. Browne HP, Forster SC, Anonye BO. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 2016; 533 (7604): 543–6.
21. Brook I. Clostridial Infections in Children: Spectrum and Management. *Curr Infect Dis Rep*. 2015; (17): 47.
22. Chia JH, Feng Y, Su LH, Wu TL, Chen CL, Liang YH, et al. Clostridium innocuum is a significant vancomycin-resistant pathogen for extraintestinal clostridial infection *Clinical Microbiology and Infection*. 2017; (23): 560–6.
23. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486 (7402): 207–14.
24. Efimov BA, Chaplin AV, Shcherbakova VA, Suzina NE, Podoprigrora IV, Shkoporov AN. *Prevotella rara* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68 (12): 3818–25.
25. Shankar V, Gouda M, Moncivaiz J, Gordon A, Reo NV, Hussein L, et al. Differences in Gut Metabolites and Microbial Composition and Functions between Egyptian and U.S. Children Are Consistent with Their Diets. *mSystems*. 2017; 2 (1): e00169–16.
26. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473 (7346): 174–80.