СИДОРЕНКО
АНАСТАСИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

ВЫДЕЛЕНИЕ, СЕЛЕКЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Научный руководитель:
к.б.н. Г.И. Новик

Минск, 2013

Род

Bifidobacterium

Семейство

Bifidobacteriaceae

Порядок

Bifidobacteriales

Класс

Actinobacteria

Отдел

Firmicutes

Царство

Bacteria

43 вида

типовой вид –
Bifidobacterium bifidum
(Tissier 1900) Orla-Jensen 1924

Характерные признаки

- **Грамположительные неспорообразующие палочки с высоким содержанием ГЦ-пар в ДНК (55 – 67 моль %)**
- **Факультативные анаэробы**
- **Ключевой фермент метаболизма гексоз – фруктозо-6-фосфат фосфокетолаза**

Бифидобактерии – представители симбиотической микрофлоры кишечника человека и животных

95 % микрофлоры кишечника здорового младенца

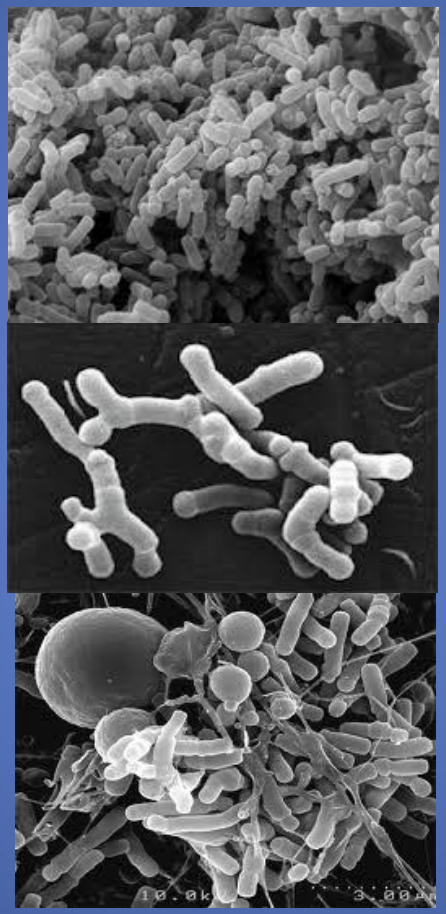
Доминирующие виды:
B. bifidum, B. breve,
B. infantis, B. longum

25 % анаэробной микрофлоры кишечника здорового взрослого

Доминирующие виды:
B. adolescentis, B. longum,
B. catenulatum,
B. pseudocatenulatum

Доминирующие виды в кишечнике животных

B. animalis,
B. thermophilum,
B. pseudolongum



Функции

- подавление развития в кишечнике патогенных и условно-патогенных микроорганизмов;
- стимуляция роста кишечной нормофлоры;
- продукция витаминов, аминокислот, короткоцепочечных жирных кислот;
- нормализация обмена веществ;
- активация иммунной системы

ПРИМЕНЕНИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Лечебно-профилактические препараты

Продукты функционального питания

- ❖ Лечение и профилактика кишечных инфекций
- ❖ Комплексная терапия инфекционных заболеваний
- ❖ Коррекция дисбиотических состояний кишечника
- ❖ Стимуляция иммунной системы
- ❖ Улучшение обмена веществ, коррекция гиперхолестеринемии
- ❖ Комплексная терапия аллергических заболеваний

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

выделение, селекция и характеристика штаммов бифидобактерий как основы для разработки пробиотиков и продуктов функционального питания

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Оптимизировать состав питательной среды для выделения бифидобактерий

Выделить, идентифицировать и охарактеризовать штаммы бифидобактерий из фекалий человека и животных, отобрать культуры, пригодные для производства пробиотиков и продуктов питания

Методом адаптивной селекции получить кислотоустойчивые штаммы бифидобактерий, перспективные для использования в составе пробиотиков и продуктов питания, исследовать их физиолого-биохимические свойства

Подобрать условия криоконсервации бифидобактерий, обеспечивающие их высокую выживаемость и сохранение физиолого-биохимических свойств

Проанализировать эффективность применения выделенных и селекционированных штаммов бифидобактерий для получения пробиотиков и продуктов питания на основе коровьего молока, соевого молока, морковного сока

Селективные компоненты

гентамицин (10–30 мкг/мл) и желчь (0,1–0,5 %) - ГЖ
хлорид лития (0,1–0,5 %) и пропионат натрия (0,1–0,5 %) – ЛП
азид натрия (0,001-0,02 %) - А

Базовые среды

среда де Мана, Рогозы, Шарпа – МРС-Б
тиогликолевая среда – ТГС
среда для анаэробов - МСК

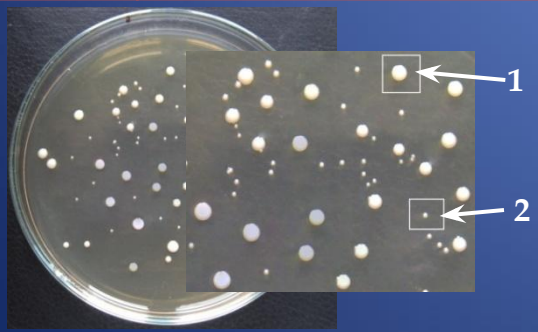
Таблица 1 – Рост коллекционных штаммов бифидобактерий, молочнокислых бактерий, энтеробактерий на разных композициях базовых питательных сред и селективных компонентов

Штамм	Композиция питательной среды														
	МРС-Б					ТГС					МСК				
	К*	ЛП	ЛПА	ГЖ	ГЖА	К	ЛП	ЛПА	ГЖ	ГЖА	К	ЛП	ЛПА	ГЖ	ГЖА
B. bifidum 791	10^{-8**}	10^{-8}	**10^{-8}**	-***	-	10^{-8}	10^{-6}	10^{-6}	-	-	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	-	-
B. bifidum ЛВА-3	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	-	-	10^{-8}	10^{-6}	10^{-6}	-	-	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	-	-
B. adolescentis МС-42	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	10^{-6}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	10^{-5}	10^{-5}
B. adolescentis ВКПМ Ac-1662	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	10^{-6}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	10^{-5}	10^{-5}
B. animalis ssp. *lactis* ВКПМ Ac-1693	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	10^{-7}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	10^{-5}	10^{-5}
B. longum B379M	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	-	-	10^{-8}	10^{-6}	10^{-6}	-	-	10^{-8}	10^{-8}	**10^{-8}**	-	-
L. fermentum БИМ B-449	10^{-8}	-	**-**	-	-	10^{-8}	-	-	-	-	10^{-8}	-	**-**	-	-
L. plantarum БИМ B-447	10^{-8}	-	**-**	-	-	10^{-8}	-	-	-	-	10^{-8}	-	**-**	-	-
L. lactis ssp. *lactis* БИМ B-132	10^{-8}	10^{-4}	**10^{-4}**	10^{-2}	10^{-2}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-8}	10^{-2}	**10^{-2}**	10^{-2}	10^{-2}
L. lactis ssp. *lactis* БИМ B-425	10^{-8}	10^{-3}	**10^{-3}**	10^{-1}	10^{-1}	10^{-8}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-8}	10^{-1}	**10^{-1}**	10^{-1}	10^{-1}
S. thermophilus БИМ B-527	10^{-8}	10^{-5}	**10^{-5}**	10^{-2}	10^{-2}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-8}	10^{-3}	**10^{-3}**	10^{-2}	10^{-2}
E. faecalis БИМ B-1012	10^{-8}	10^{-4}	**10^{-3}**	10^{-3}	10^{-3}	10^{-8}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-8}	10^{-3}	**10^{-3}**	10^{-3}	10^{-3}
E. coli БИМ B-379	10^{-8}	10^{-8}	**-**	10^{-8}	-	10^{-8}	10^{-8}	-	10^{-8}	-	10^{-8}	10^{-8}	**-**	-	-

Примечания – К* – контроль, 10^{-8}** – последнее разведение, при высеве которого формировались изолированные колонии (<10 на чашку), -*** – отсутствие роста

Таблица 2 – Результаты тестирования селективности питательных сред МРС-ЛПА и МСК-ЛПА с использованием образцов пробиотиков, кисломолочных продуктов, фекалий человека и животных

Среда	Морфология колоний	% от выросших колоний	Родовая принадлежность
МРС-ЛПА	мелкие прозрачные округлые блестящие выпуклые	0-2	*Lactobacillus*
	крупные полупрозрачные с неровным краем и выпуклым белым центром		
	мелкие сероватые округлые блестящие выпуклые		
	крупные желтые блестящие с выпуклым центром		
	крупные белые блестящие округлые	28-30	*Lactococcus* *Streptococcus* *Enterococcus* *Bifidobacterium*
	мелкие белые блестящие выпуклые округлые	60	
МСК-ЛПА	мелкие округлые прозрачные выпуклые	0-2	*Lactobacillus*
	крупные полупрозрачные с неровным краем и выпуклым белым центром		
	крупные округлые белые блестящие выпуклые	**80**	***Bifidobacterium***
	мелкие округлые белые блестящие выпуклые	**18-20**	***Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus***

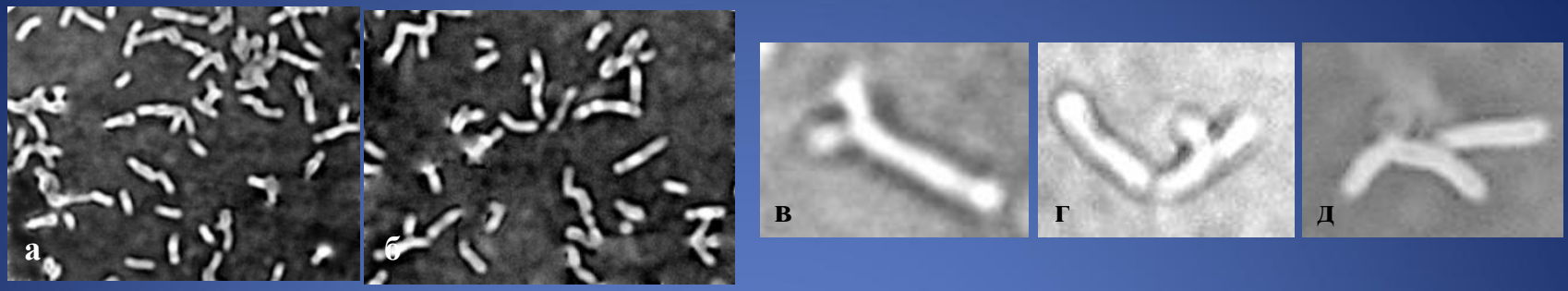


1 – колонии бифидобактерий,
2 – колонии молочнокислых кокков
Рисунок 1 – Морфология колоний, сформировавшихся на среде МСК-ЛПА , при посеве фекалий человека

Положение, выносимое на защиту (1):

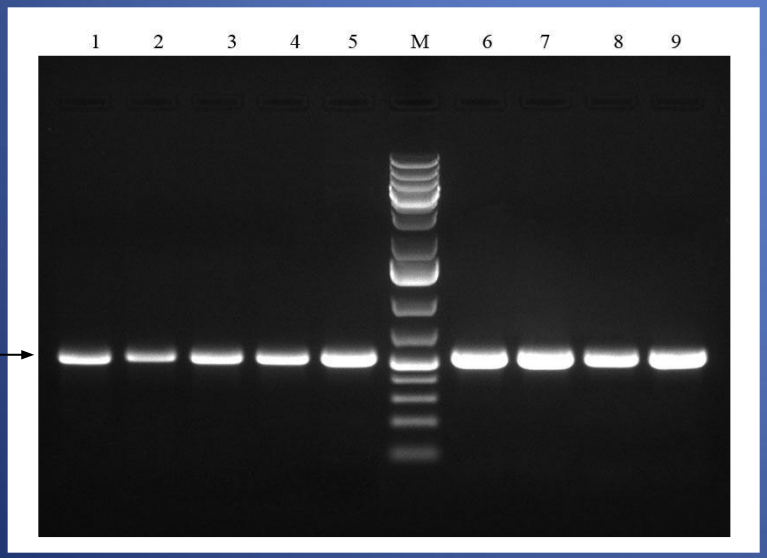
Питательная среда для выделения бифидобактерий на основе среды для анаэробов с добавлением селективных компонентов – хлорида лития, пропионата натрия и азида натрия, обеспечивает преимущественный рост представителей рода *Bifidobacterium* и позволяет дифференцировать их от молочнокислых бактерий

Рисунок 2 – Морфология клеток бифидобактерий, выделенных из фекалий человека



а, в, г – Н1, б, д – Н2, световая микроскопия 1×2 000 (а, б) и 1×5 000 (в–д)

Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК выделенных культур бифидобактерий родоспецифичными праймерами Bif-164-f и Bif-662-r



1 – Н1, 2 – В3, 3 – А4, 4 – А6, 5 – И1, 6 – С6, 7 – К3, 8 – Д1, 9 – 4, М – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 1 kb Plus Ladder

Таблица 3 – Штаммы бифидобактерий и источники их выделения

Источник выделения	Штаммы бифидобактерий
Фекалии людей	*Bifidobacterium* sp. Н1, Н2, Н3, В3, А4, А6, И1
Фекалии коз	*Bifidobacterium* sp. КО3, КО4, 4
Фекалии коров	*Bifidobacterium* sp. Д1, Д3, Д4
Фекалии свиней	*Bifidobacterium* sp. С6, 6
Фекалии кур	*Bifidobacterium* sp. К3, К4

КРИТЕРИИ ОТБОРА БИФИДОБАКТЕРИЙ

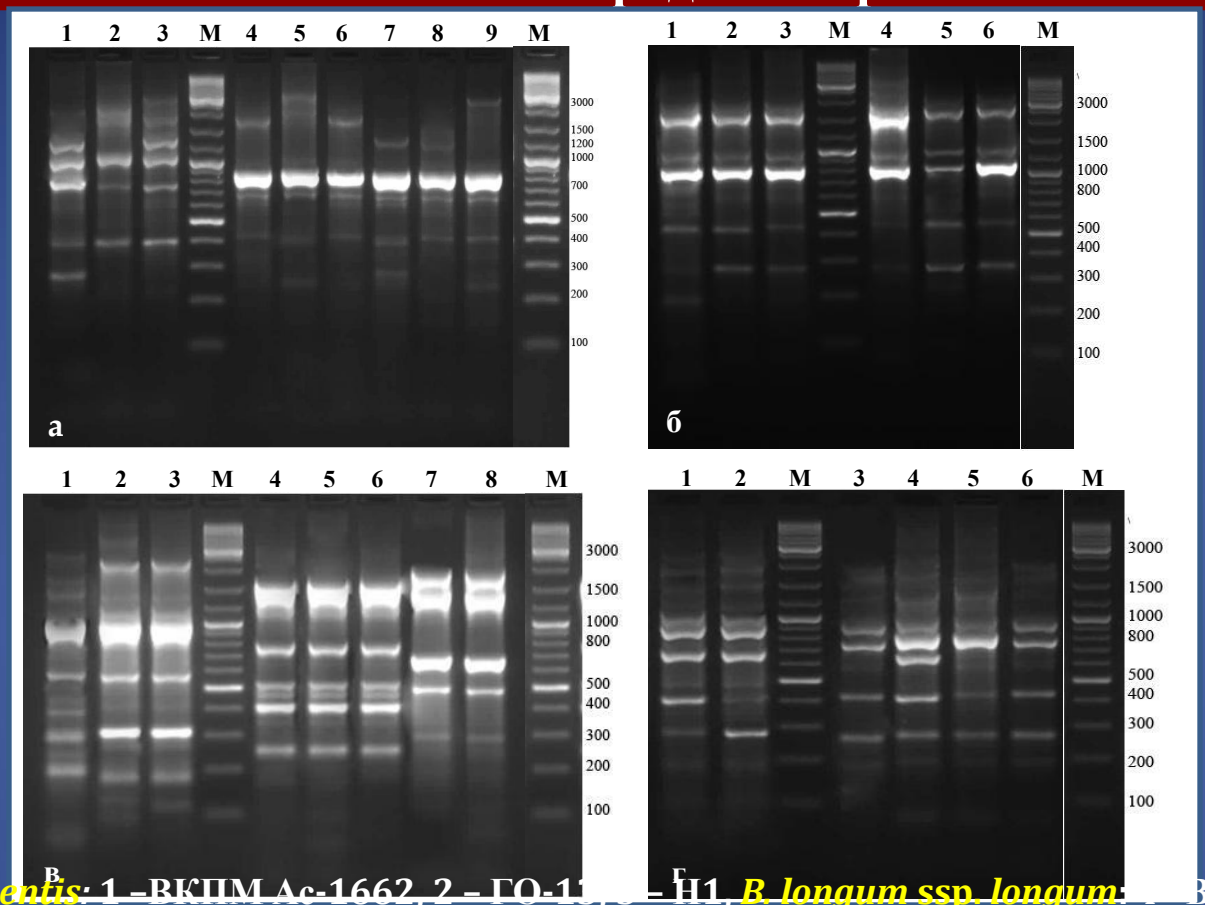
- **жизнеспособность и стабильность фенотипических признаков при лабораторном культивировании;**
- **интенсивный рост в искусственных питательных средах;**
- **способность к росту в микроаэрофильных условиях**

Таблица 5 – Результаты видовой идентификации бифидобактерий методом двухлокусного секвенирования

Штамм	Видовая принадлежность	
	ген 16S рРНК	ген трансальдолазы (*tal*)
Bifidobacterium sp. H1	*B. adolescentis*	*B. adolescentis*
Bifidobacterium sp. H2	*B. animalis*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. H3	*B. longum*	*B. adolescentis*
Bifidobacterium sp. A4	*B. longum*	*B. longum*
Bifidobacterium sp. A6	*B. animalis*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. B3	*B. longum*	*B. longum*
Bifidobacterium sp. И1	*B. animalis*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. K3	*B. animalis*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. K4	*B. pseudolongum*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. 6	*B. boum*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. C6	*B. pseudolongum*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. KO3	*B. animalis*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. KO4	*B. animalis*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. 4	*B. thermophilum*	*B. thermophilum*
Bifidobacterium sp. Д1	*B. animalis*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. Д3	*B. boum*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*
Bifidobacterium sp. Д4	*B. boum*	*B. animalis / bifidum / breve / longum*

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК и гена трансальдолазы 17-ти новых штаммов бифидобактерий депонированы в международной базе данных GenBank (номера доступа: JN020353–JN020359, JN091120–JN091129, JN091098–JN091104, JN091110–JN091119)

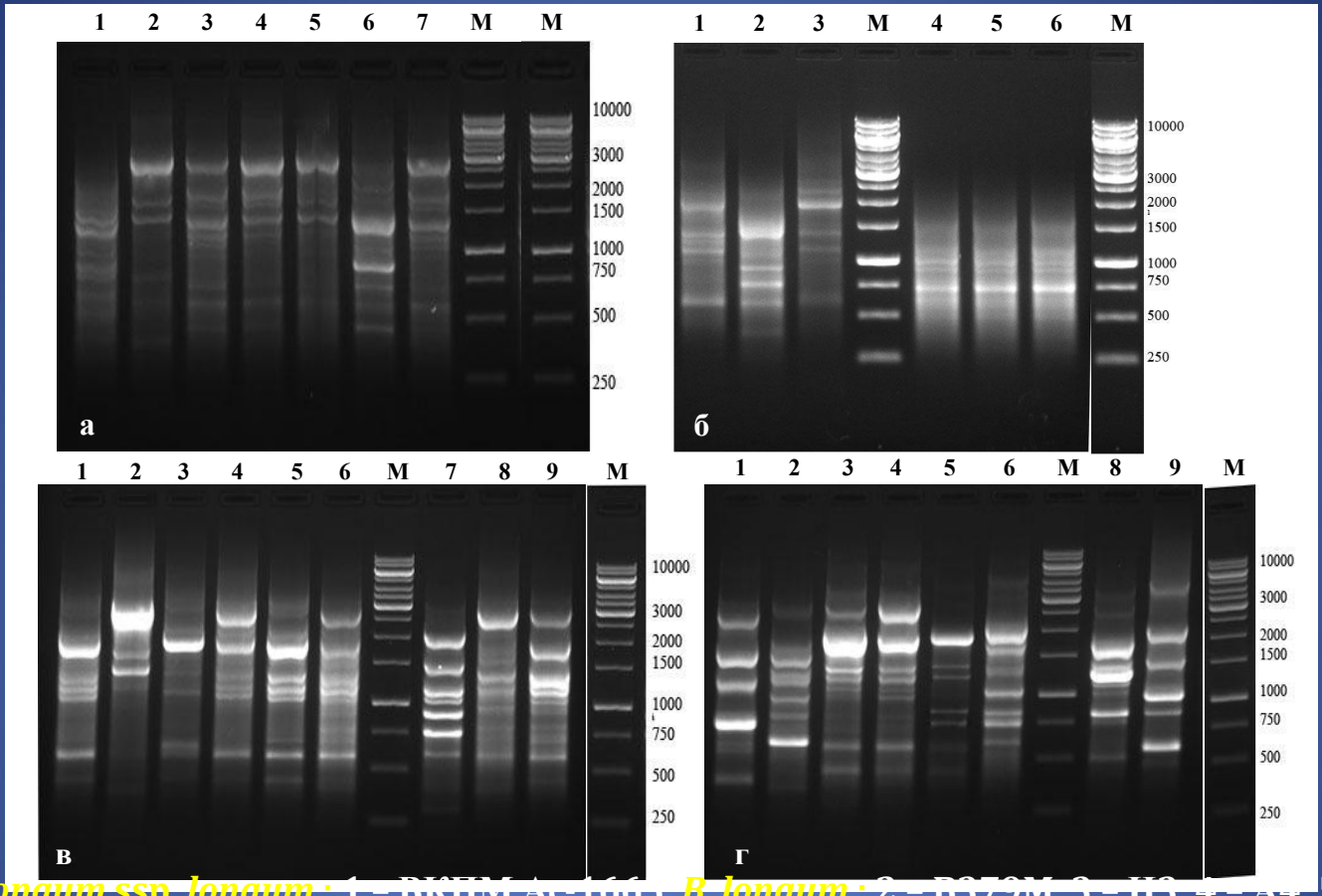
Рисунок 4 – ERIC-ПЦР профили выделенных и коллекционных штаммов бифидобактерий



а) *B. adolescentis*: 1 –ВКПМ Ac-1662, 2 – ГО-1[illegible] – Н1, *B. longum ssp. longum*: [illegible] –ВКПМ Ac-1665, *B. longum ssp. infantis*: 5 –ВКПМ Ac-1732, *B. longum*: 6 – Н3, 7 – А4, 8 – В3, 9 – БИМ В-521; б) *B. animalis ssp. lactis*: 1 –ВКПМ Ac-1663, 2 – БИМ В-522, 3 – БИМ В-523, *B. animalis*: 4 –Н2, 5 –А6, 6 – И1; в) *B. pseudolongum ssp. globosum*: 1 –ВКПМ Ac-1752, *B. pseudolongum*: 2 – С6, 3 – К4, *B. boum*: 4 –Д3, 5 –Д4, 6 –6, *B. thermophilum*: 7 –ВКПМ Ac-1746, 8 – 4; г) *B. animalis ssp. animalis*: 1 – ВКПМ Ac-1693, 2 – ВКПМ Ac-1747, *B. animalis*: 3 – К3, 4 – КО3, 5 – КО4, 6 – Д1,

М – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 1 kb Plus (Fermentas)

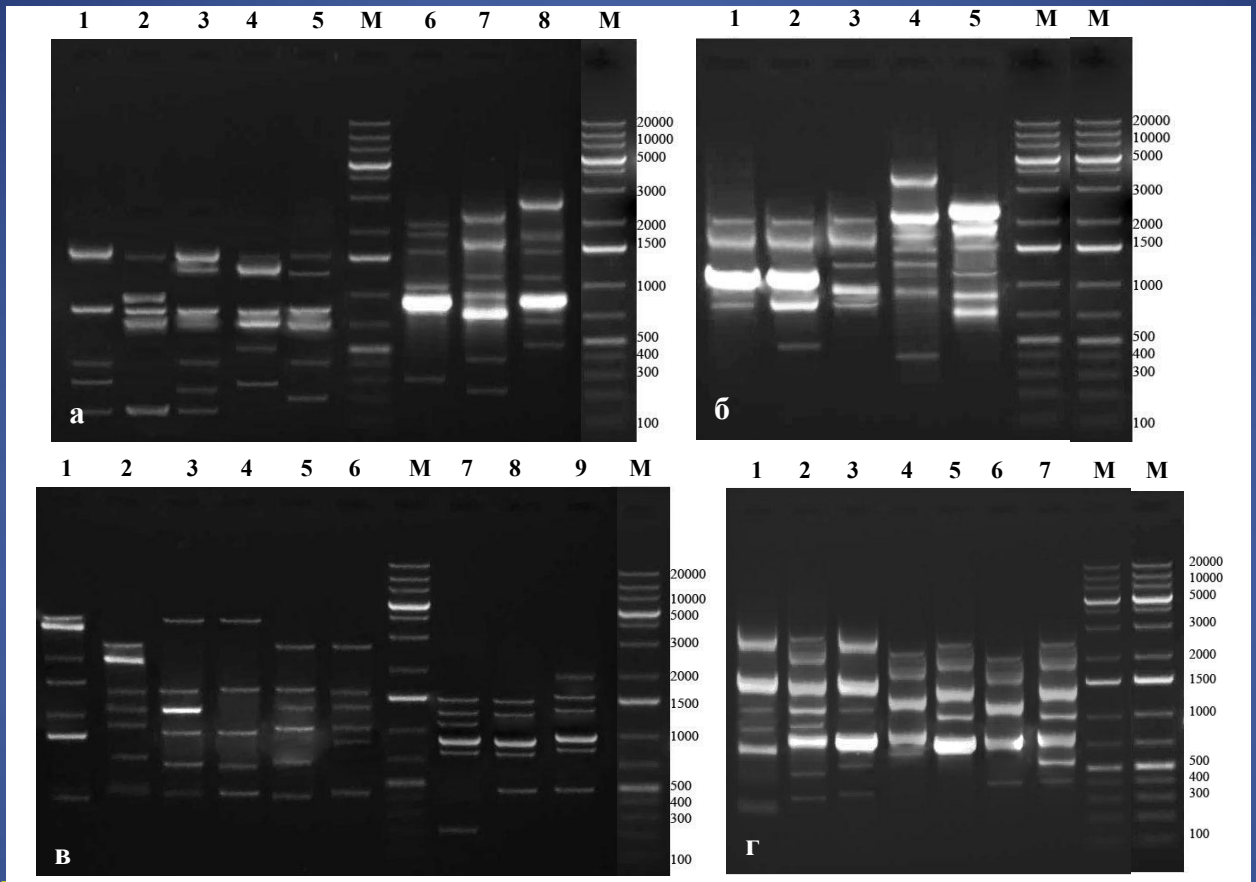
Рисунок 5 – $(GTG)_5$-ПЦР профили выделенных и коллекционных штаммов бифидобактерий



а) *B. longum* ssp. *longum* : 1 – ВКПМ Ac-1663, *B. longum* : 2 – B379M, 3 – Н3, 4 – А4, 5 – В3, *B. longum* ssp. *infantis:* 6 – ВКПМ Ac-1732, 7 – БИМ В-521; б) *B. adolescentis* : 1 –ВКПМ Ac-1662, 2 – ГО-13, 3 – Н1, *B. boum* 4 – 6, 5 – Д3, 6 – Д4; в) *B. animalis* ssp. *lactis:* 1 –ВКПМ Ac-1663, 2 – БИМ В-522, 3 – БИМ В-523, 4 –Н2, 5 – А6, 6 – И1, *B. pseudolongum* ssp. *globosum* : 7 –ВКПМ Ac-1752, 8 – С6, 9 – К4; д) *B. animalis* ssp. *animalis* : 1 –ВКПМ Ac-1693, 2 –ВКПМ Ac-1747, 3 – К3, 4 – КО3, 5 – КО4, 6 – Д1, *B. thermophilum:* 7 –ВКПМ Ac-1746, 8 – 4,

M – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 1 kb Plus (Fermentas)

Рисунок 6 – RAPD-ПЦР профили выделенных и коллекционных штаммов бифидобактерий



а) *B. animalis* ssp. *lactis:* 1 – ВКПМ Ac-1693, 2 – БИМ B-522, 3 – БИМ B-523, 4 – Н2, 5 – А6, 6 – И1, *B. adolescentis:* 7 – ВКПМ Ac-1662, 8 – Н1; б) *B. pseudolongum* ssp. *globosum:* 1 – ВКПМ Ac-1752, *B. pseudolongum:* 2 – С6, 3 – К4, *B. thermophilum:* 4 – ВКПМ Ac-1746, 5 – 4; в) *B. animalis* ssp. *animalis* :1 – ВКПМ Ac-1663, 2 – ВКПМ Ac-1747, 3 – К3, 4 – Д1, 5 – КО3, 6 – КО4, *B. boum:* 7 – Д3, 8 – Д4, 9 – 6; г) *B. longum* ssp. *infantis:* 1 – ВКПМ Ac-1665, *B. longum* ssp. *longum:* 2 –ВКПМ Ac-1732, *B. longum:* 3 – В379М, 4 – БИМ B-521, 5 – Н3, 6 – В3, 7 – А4, M – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler Ladder Mix (Fermentas)

Требования, предъявляемые к производственным штаммам бифидобактерий

- Интенсивное накопление биомассы и кислотообразование в типовых питательных средах (титр клеток >10^8 КОЕ/мл через 24 ч)
- Высокая жизнеспособность при хранении (>10^7 КОЕ/мл при 4 °С)
- Устойчивость к неблагоприятным условиям желудочно-кишечного тракта, высокой температуре, кислороду
- Антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, отсутствие антагонизма в отношении представителей нормальной кишечном микрофлоры
- Чувствительность к антибиотикам, включенным в перечень Европейского ведомства по безопасности пищевых продуктов (EFSA), отсутствие внехромосомных генетических элементов (плазмид)

Таблица 6 – Показатели титра клеток и снижения pH среды, полученные при культивировании выделенных и референтных штаммов бифидобактерий в питательных средах МРС-Б и БС

Штамм	Питательная среда			
	МРС-Б		БС	
	титр клеток, КОЕ/мл	pH	титр клеток, КОЕ/мл	pH
ВЫДЕЛЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ				
B. adolescentis Н1	$1,1\pm0,2\times10^{10}$	4,7±0,3	$1,0\pm0,3\times10^{10}$	4,6±0,3
B. longum Н3	$1,2\pm1,1\times10^{10}$	4,6±0,3	$1,3\pm0,3\times10^{10}$	4,6±0,3
B. longum В3	$1,1\pm0,3\times10^{10}$	4,1±0,2	$1,4\pm0,2\times10^{10}$	4,0±0,2
B. longum А4	$1,6\pm0,3\times10^{10}$	4,4±0,3	$1,2\pm0,3\times10^{10}$	4,3±0,2
B. animalis ssp. *lactis* Н2	$1,8\pm0,2\times10^{10}$	4,3±0,2	$1,6\pm0,4\times10^{10}$	4,2±0,3
B. animalis ssp. *lactis* А6	$1,2\pm0,1\times10^{10}$	4,2±0,3	$1,8\pm0,3\times10^{10}$	4,1±0,1
B. animalis ssp. *lactis* И1	$1,8\pm0,3\times10^{10}$	4,3±0,2	$1,6\pm0,3\times10^{10}$	4,3±0,2
B. *pseudolongum* С6	$1,3\pm0,2\times10^{10}$	4,5±0,3	$1,5\pm0,2\times10^{10}$	4,5±0,1
B. pseudolongum К4	$1,1\pm0,4\times10^{10}$	4,5±0,2	$1,4\pm0,3\times10^{10}$	4,5±0,2
B. animalis ssp. *animalis* К3	$1,5\pm0,3\times10^{10}$	4,2±0,2	$1,6\pm0,2\times10^{10}$	4,2±0,1
B. animalis ssp. *animalis* КО3	$1,6\pm0,3\times10^{10}$	4,4±0,2	$1,4\pm0,3\times10^{10}$	4,3±0,2
B. animalis ssp. *animalis* КО4	$1,8\pm0,4\times10^{10}$	4,3±0,3	$2,0\pm1,0\times10^{10}$	4,3±0,2
B. animalis ssp. *animalis* Д1	$6,0\pm2,2\times10^{9}$	4,4±0,3	$1,1\pm0,3\times10^{9}$	4,4±0,1
B. boum Д3	$8,1\pm3,1\times10^{9}$	4,7±0,2	$1,3\pm0,3\times10^{9}$	4,7±0,3
B. boum Д4	$7,6\pm2,0\times10^{9}$	4,6±0,2	$1,2\pm0,2\times10^{9}$	4,5±0,3
B. boum 6	$1,5\pm0,2\times10^{10}$	4,6±0,2	$1,5\pm0,3\times10^{10}$	4,6±0,3
B. thermophilum 4	$1,2\pm0,3\times10^{10}$	4,8±0,1	$1,4\pm0,3\times10^{10}$	4,9±0,2
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ				
B. longum	$8,0\pm2,1\times10^{8}$	4,7±0,2	$1,0\pm2,0\times10^{8}$	4,6±0,3
B. animalis ssp. *lactis* 1	$9,4\pm3,2\times10^{9}$	4,6±0,2	$1,1\pm0,3\times10^{10}$	4,7±0,3
B. animalis ssp. *lactis* 2	$1,2\pm0,2\times10^{10}$	4,6±0,2	$1,5\pm0,3\times10^{10}$	4,5±0,2
B. angulatum	$9,2\pm0,3\times10^{9}$	4,1±0,3	$2,0\pm1,0\times10^{9}$	4,1±0,1
B. bifidum	$2,2\pm1,4\times10^{10}$	3,9±0,3	$5,0\pm2,0\times10^{10}$	3,9±0,2

Таблица 7 – Время сквашивания, показатели титра клеток и снижения pH среды, полученные при культивировании выделенных и референтных штаммов бифидобактерий в коровьем молоке

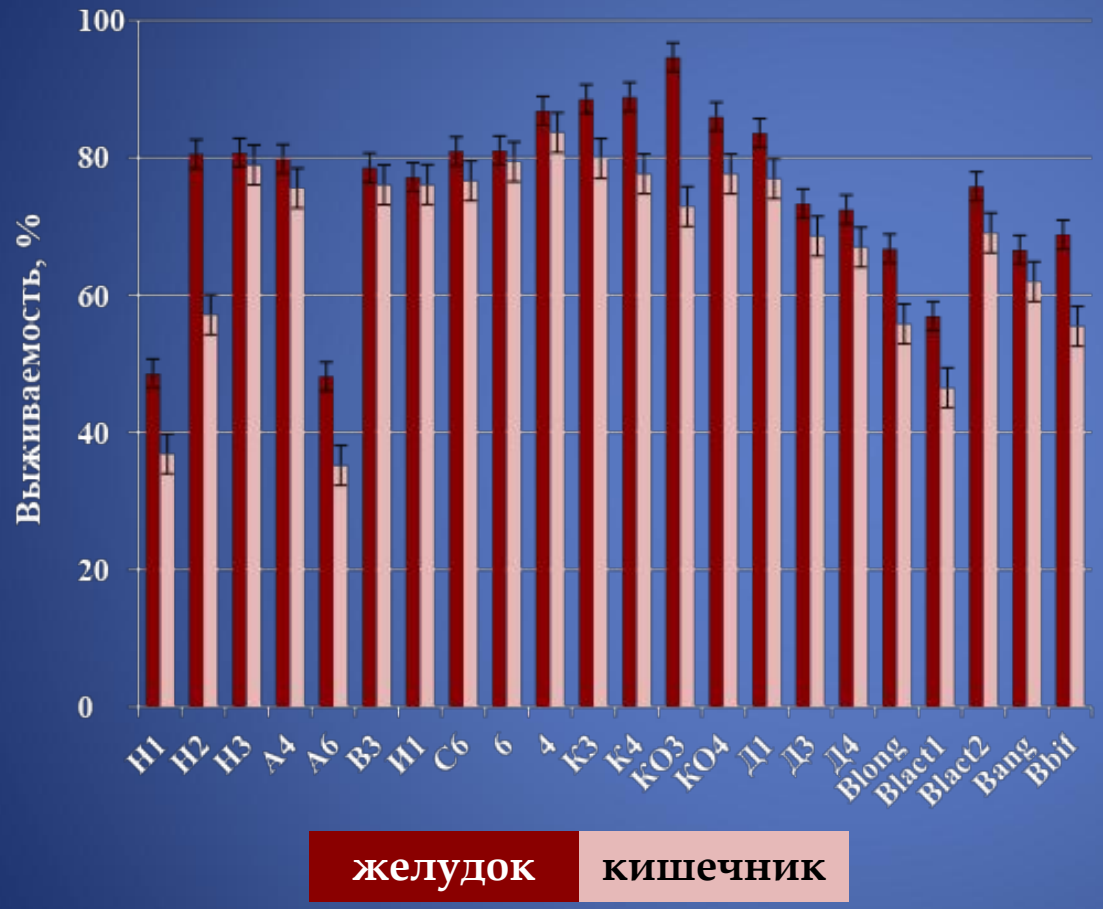
Штамм	Показатель		
	время сквашивания, ч	титр клеток, КОЕ/мл	pH
ВЫДЕЛЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ			
B. adolescentis H1	26	$8,2\pm2,1\times10^{8*}$	4,9±0,2
B. longum H3	15	$3,5\pm1,0\times10^{9}$	4,9±0,2
B. longum B3	12	$1,4\pm0,3\times10^{10}$	4,3±0,2
B. longum A4	12	$2,2\pm1,6\times10^{10}$	4,8±0,2
B. animalis ssp. *lactis* H2	14	$3,4\pm2,0\times10^{9}$	4,8±0,1
B. animalis ssp. *lactis* A6	15	$1,8\pm0,3\times10^{10}$	4,8±0,2
B. animalis ssp. lactis И1	17	$9,1\pm1,3\times10^{9}$	4,9±0,3
B. pseudolongum C6	-**	$5,2\pm2,1\times10^{7}$	6,4±0,1
B. pseudolongum K4	32	$3,4\pm1,1\times10^{8}$	4,4±0,2
B. animalis ssp. *animalis* K3	32	$6,2\pm2,5\times10^{8}$	4,3±0,2
B. animalis ssp. *animalis* КО3	26	$4,0\pm1,4\times10^{8}$	4,6±0,2
B. animalis ssp. *animalis* КО4	30	$2,4\pm1,2\times10^{8}$	4,2±0,1
B. animalis ssp. *animalis* Д1	26	$5,3\pm2,6\times10^{8}$	4,2±0,1
B. boum Д3	36	$3,1\pm1,4\times10^{8}$	4,6±0,2
B. boum Д4	-	$4,4\pm2,0\times10^{7}$	6,7±0,1
B. boum 6	28	$5,2\pm3,0\times10^{8}$	4,4±0,3
B. thermophilum 4	-	$4,5\pm2,1\times10^{7}$	6,7±0,1
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ			
B. longum	18	$7,3\pm2,2\times10^{8}$	4,2±0,3
B. animalis ssp. *lactis* 1	10	$7,1\pm3,5\times10^{9}$	3,9±0,1
B. animalis ssp. *lactis* 2	10	$8,4\pm3,2\times10^{9}$	3,9±0,1
B. angulatum	-	$3,3\pm1,7\times10^{7}$	6,3±0,2
B. bifidum	10	$5,2\pm2,3\times10^{9}$	4,4±0,1

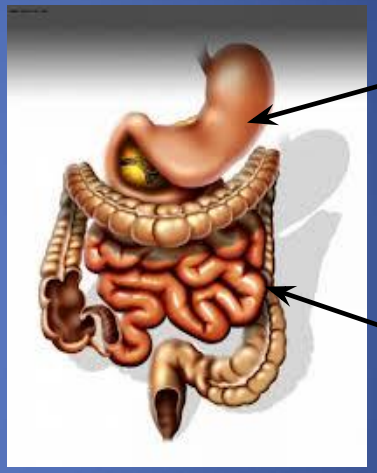
Примечание – * - титр клеток и pH на момент образования сгустка, -** – без образования сгустка

Таблица 8 – Жизнеспособность выделенных и референтных штаммов бифидобактерий при хранении при 4 °С в среде МРС-Б и сквашенном молоке

Штамм	Титр клеток, КОЕ/мл			
	МРС-Б		Сквашенное молоко	
	0 сут	30 сут	0 сут	10 сут
ВЫДЕЛЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ				
B. adolescentis Н1	$1,2\pm0,3\times10^{9}$	$5,3\pm2,4\times10^{7}$	$8,0\pm2,1\times10^{8}$	$4,4\pm2,2\times10^{6}$
B. longum Н3	$1,2\pm0,1\times10^{10}$	$8,2\pm4,3\times10^{8}$	$3,5\pm1,3\times10^{9}$	$3,1\pm1,6\times10^{6}$
B. longum В3	$1,1\pm0,3\times10^{10}$	$6,0\pm3,4\times10^{8}$	$1,4\pm0,3\times10^{10}$	$6,3\pm4,1\times10^{7}$
B. longum А4	$1,5\pm0,2\times10^{10}$	$9,5\pm5,2\times10^{7}$	$2,2\pm1,5\times10^{10}$	$7,5\pm5,1\times10^{7}$
B. animalis ssp. *lactis* Н2	$1,8\pm0,2\times10^{10}$	$3,3\pm1,5\times10^{8}$	$3,8\pm2,6\times10^{9}$	$6,2\pm3,7\times10^{8}$
B. animalis ssp. *lactis* А6	$1,2\pm0,1\times10^{10}$	$1,2\pm0,2\times10^{8}$	$1,8\pm0,4\times10^{10}$	$1,5\pm0,2\times10^{8}$
B. *animalis* ssp. *lactis* И1	$1,8\pm0,3\times10^{10}$	$7,3\pm4,1\times10^{7}$	$9,5\pm1,8\times10^{9}$	$5,3\pm3,2\times10^{7}$
B. pseudolongum С6	$1,3\pm0,2\times10^{10}$	$3,6\pm2,8\times10^{8}$	-	-
B. pseudolongum К4	$1,1\pm0,4\times10^{10}$	$5,4\pm3,3\times10^{7}$	$3,2\pm1,9\times10^{8}$	$2,8\pm1,0\times10^{6}$
B. animalis ssp. *animalis* К3	$1,5\pm0,3\times10^{10}$	$4,6\pm2,2\times10^{7}$	$6,6\pm2,7\times10^{8}$	$4,5\pm3,0\times10^{6}$
B. animalis ssp. *animalis* КО3	$1,6\pm0,3\times10^{10}$	$6,6\pm3,1\times10^{7}$	$4,0\pm1,8\times10^{8}$	$5,4\pm4,2\times10^{6}$
B. animalis ssp. *animalis* КО4	$1,8\pm0,4\times10^{10}$	$5,8\pm2,9\times10^{7}$	$2,6\pm1,1\times10^{8}$	$2,0\pm1,1\times10^{6}$
B. animalis ssp. *animalis* Д1	$6,2\pm2,0\times10^{9}$	$2,0\pm1,3\times10^{7}$	$5,9\pm2,3\times10^{8}$	$4,6\pm2,6\times10^{5}$
B. boum Д3	$8,1\pm1,3\times10^{9}$	$2,1\pm3,5\times10^{8}$	$3,4\pm1,2\times10^{8}$	$6,8\pm4,2\times10^{5}$
B. boum Д4	$7,0\pm2,1\times10^{9}$	$4,9\pm1,0\times10^{8}$	-	-
B. boum 6	$1,5\pm0,2\times10^{10}$	$6,4\pm3,2\times10^{8}$	$5,6\pm3,2\times10^{8}$	$2,9\pm1,2\times10^{6}$
B. thermophilum 4	$1,2\pm0,3\times10^{10}$	$7,5\pm4,1\times10^{9}$	-	-
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ				
B. longum	$8,1\pm2,3\times10^{9}$	$5,2\pm2,9\times10^{6}$	$7,3\pm2,0\times10^{8}$	$4,4\pm2,1\times10^{6}$
B. animalis ssp. *lactis* 1	$9,2\pm3,1\times10^{10}$	$3,3\pm1,6\times10^{8}$	$7,7\pm3,1\times10^{9}$	$6,8\pm2,2\times10^{8}$
B. animalis ssp. *lactis* 2	$1,2\pm0,2\times10^{10}$	$4,8\pm2,0\times10^{8}$	$8,5\pm3,2\times10^{9}$	$8,8\pm5,9\times10^{8}$
B. angulatum	$9,8\pm3,5\times10^{10}$	$4,6\pm2,2\times10^{7}$	-	-
B. bifidum	$2,9\pm1,7\times10^{10}$	$8,7\pm4,3\times10^{8}$	$5,4\pm2,0\times10^{9}$	$4,0\pm2,1\times10^{7}$

Рисунок 7 – Выживаемость выделенных и референтных штаммов бифидобактерий в модельных условиях пищеварительного тракта

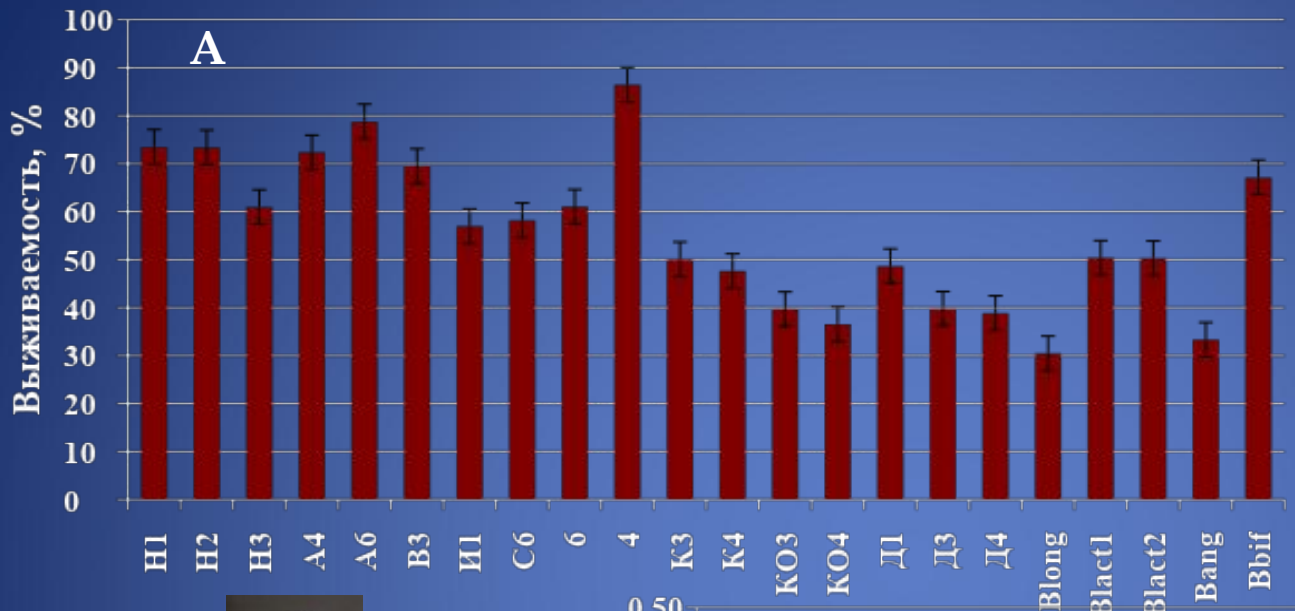




pH 2,0, пепсин, 3 ч

pH 8,2, желчь , трипсин, 6 ч

Рисунок 8 – Устойчивость выделенных и референтных штаммов бифидобактерий к высокой температуре (а) и кислороду (б)



Инкубация
15 мин при 65 °С

АЭ/АНАЭ – соотношение показателей накопления биомассы бифидобактерий при культивировании в аэробных и анаэробных условиях

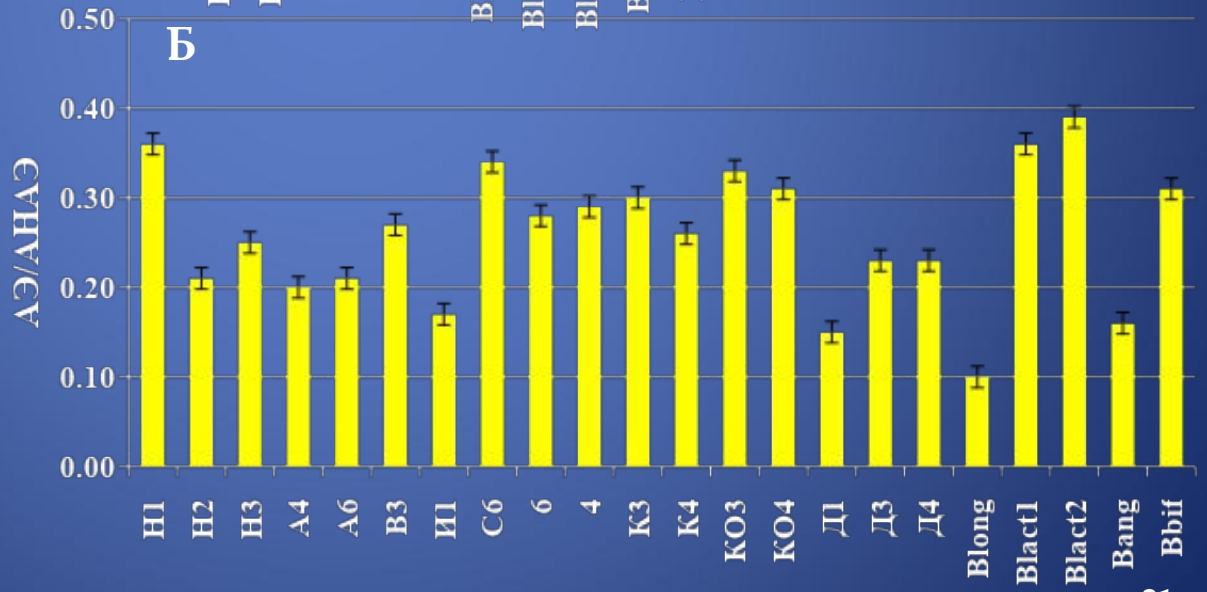


Рисунок 9 – Способность выделенных штаммов бифидобактерий образовывать экзополисахариды

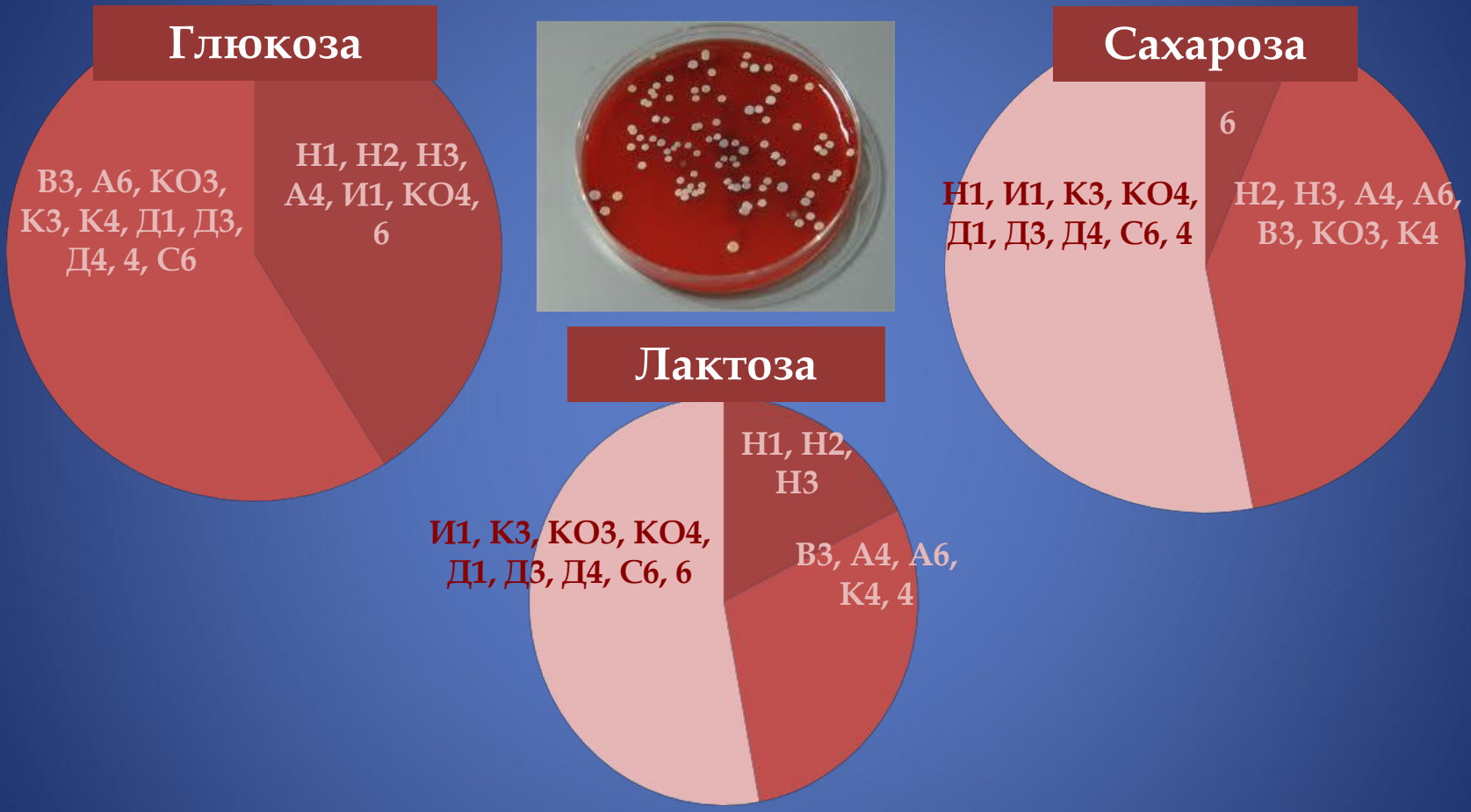


Таблица 9 – Антагонистическая активность выделенных и референтных штаммов бифидобактерий по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам

Штамм	Тест-культура											
	E. coli					*Ps. aeruginosa*		*P. vulgaris*	*B. cereus*		*S. aureus*	*Enterobacter* sp.
	БИМ В-238	БИМ В-378	БИМ В-379	К-3	КМПЭ В-39А	БИМ В-153	БИМ В-155	БИМ В-752	БИМ В-108	БИМ В-169	КМПЭ В-1071	БИМ В-246
	радиус зоны подавления роста вокруг лунки, мм											
ВЫДЕЛЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ												
Н1	4,1±0,2	5,1±0,2	**10,0±0,3**	4,2±0,2	**8,1±0,3**	3,0±0,3	10,1±0,2	2,2±0,1	2,0±0,2	2,1±0,2	**12,0±0,3**	-
Н3	2,2±0,1	1,3±0,1	**10,1±0,2**	-*	2,2±0,2	2,1±0,2	3,2±0,1	3,1±0,2	1,1±0,2	3,0±0,2	4,1±0,2	-
В3	2,1±0,3	2,0±0,3	**10,0±0,3**	2,1±0,3	4,2±0,2	3,2±0,2	5,0±0,2	4,2±0,1	2,2±0,2	1,2±0,2	**10,0±0,2**	1,0±0,2
А4	2,4±0,1	2,3±0,2	**10,0±0,4**	**6,1±0,2**	**6,0±0,2**	2,1±0,2	4,3±0,2	**8,4±0,2**	1,0±0,1	4,0±0,2	**10,0±0,3**	-
Н2	**5,0±0,2**	5,4±0,2	**10,3±0,2**	4,2±0,2	**6,3±0,3**	3,2±0,1	5,3±0,2	**6,2±0,1**	1,0±0,1	2,3±0,1	**14,1±0,2**	2,1±0,2
А6	**5,1±0,3**	**8,2±0,3**	**10,1±0,2**	**6,0±0,3**	**6,1±0,3**	5,0±0,3	10,1±0,3	**6,1±0,1**	4,3±0,2	**6,1±0,3**	4,3±0,2	1,1±0,1
И1	1,3±0,1	1,1±0,2	6,4±0,3	-	2,0±0,2	1,2±0,1	2,0±0,2	2,4±0,2	-	1,2±0,1	4,2±0,2	-
С6	2,1±0,2	2,1±0,2	5,2±0,2	4,0±0,1	**8,2±0,2**	8,0±0,2	15,2±0,4	3,0±0,1	**6,1±0,3**	**8,0±0,3**	6,0±0,3	2,0±0,1
К4	1,4±0,2	-	-	4,0±0,1	4,1±0,3	8,1±0,3	6,3±0,3	5,2±0,2	-	1,3±0,1	2,1±0,1	-
К3	-	1,3±0,1	-	4,2±0,2	**6,2±0,3**	8,3±0,3	10,1±0,3	5,1±0,1	-	-	4,3±0,1	-
КО3	-	4,2±0,2	2,1±0,3	4,4±0,2	2,0±0,1	9,2±0,4	**12,1±0,4**	**7,3±0,2**	-	-	4,2±0,2	1,2±0,1
КО4	1,0±0,2	3,3±0,3	1,3±0,2	4,1±0,3	2,2±0,2	9,1±0,4	**16,2±0,3**	1,2±0,1	2,0±0,1	-	2,0±0,1	-
Д1	2,4±0,2	1,0±0,2	-	4,1±0,2	2,2±0,2	9,4±0,2	8,3±0,3	1,1±0,1	-	-	4,1±0,2	-
Д3	2,2±0,3	4,0±0,1	1,1±0,2	4,3±0,1	**8,1±0,3**	**12,1±0,3**	**14,1±0,4**	1,0±0,2	-	1,4±0,1	4,0±0,1	-
Д4	2,2±0,3	1,2±0,2	1,4±0,2	4,4±0,3	4,0±0,3	**16,1±0,3**	**18,0±0,3**	1,0±0,1	2,2±0,2	-	4,2±0,2	-
6	4,3±0,2	**6,1±0,3**	7,2±0,3	**8,0±0,3**	**6,1±0,3**	**10,3±0,3**	**20,1±0,3**	**6,1±0,2**	**9,0±0,3**	**9,0±0,2**	**8,0±0,2**	2,2±0,1
4	**6,1±0,2**	**8,2±0,3**	**10,3±0,3**	**8,2±0,3**	**6,0±0,3**	**18,2±0,4**	**20,2±0,4**	**6,5±0,1**	**6,3±0,3**	**9,2±0,3**	6,2±0,3	2,3±0,1
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ												
Blong	6,2±0,3	-	1,0±0,1	4,3±0,2	2,1±0,2	10,1±0,3	8,0±0,2	3,1±0,2	-	-	4,2±0,2	-
Blact 1	-	-	-	-	4,0±0,1	8,0±0,2	8,3±0,3	-	-	-	-	-
Blact 2	-	-	-	-	1,1±0,1	9,2±0,3	7,0±0,2	1,0±0,1	-	-	1,0±0,1	-
Bang	10,0±0,2	4,3±0,3	10,1±0,4	2,0±0,3	6,2±0,3	2,2±0,1	15,1±0,4	2,3±0,2	6,1±0,3	-	8,1±0,3	1,0±0,2
Bbif	15,1±0,3	10,2±0,2	10,0±0,4	16,1±0,4	12,0±0,4	20,3±0,3	20,3±0,4	3,6±0,1	8,2±0,3	6,4±0,3	16,2±0,4	2,2±0,2

Примечание -* – отсутствие ингибирования роста

Таблица 10 – Чувствительность выделенных и референтных штаммов бифидобактерий к антибиотикам, включенным в перечень EFSA

Штамм	Антибиотик								
	Ap	Gm	Gr	Lm	Pen	Str	Cm	Tet	Er
	минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл								
Норма EFSA	2,0	64,0	-*	-	-	128,0	4,0	8,0	0,5
ВЫДЕЛЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ									
B. adolescentis Н1	1,0	60,0	1,0	0,2	1,0	100,0	4,0	10,0	0,1
B. longum Н3	0,5	20,0	2,0	0,1	0,2	80,0	1,0	8,0	0,05
B. longum В3	1,0	20,0	2,0	0,5	5,0	100,0	2,5	2,5	0,2
B. longum А4	0,5	30,0	0,8	0,4	0,5	100,0	2,0	10,0	0,5
B. animalis ssp. *lactis* Н2	0,5	50,0	3,0	0,1	0,5	100,0	2,0	10,0	0,05
B. animalis ssp. *lactis* А6	4,0	30,0	2,0	1,0	4,0	200,0	4,0	6,0	0,1
B. animalis ssp. *lactis* И1	1,0	50,0	1,0	0,1	0,5	100,0	4,0	10,0	0,05
B. pseudolongum С6	2,0	80,0	0,8	0,1	1,0	100,0	2,5	4,0	0,2
B. pseudolongum К4	2,0	100,0	0,8	0,5	1,0	150,0	4,0	5,0	0,05
B. animalis ssp. *animalis* К3	1,0	120,0	1,0	0,2	2,0	100,0	3,0	5,0	0,1
B. animalis ssp. *animalis* КО3	1,5	100,0	2,0	0,2	2,0	80,0	1,5	6,0	0,1
B. animalis ssp. *animalis* КО4	1,0	50,0	2,0	0,5	2,0	80,0	1,5	8,0	0,2
B. animalis ssp. *animalis* Д1	3,0	60,0	1,0	0,1	4,0	250,0	1,0	10,0	0,5
B. boum Д3	1,0	40,0	1,0	1,0	1,0	80,0	4,0	8,0	0,2
B. boum Д4	1,0	40,0	1,0	0,5	0,5	100,0	3,0	8,0	0,05
B. boum 6	0,5	60,0	1,0	0,7	1,0	80,0	4,0	5,0	0,2
B. thermophilum 4	0,5	60,0	0,8	1,0	5,0	100,0	2,0	6,0	0,5
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ									
B. longum	0,5	30,0	1,0	0,1	1,0	100,0	2,0	5,0	0,1
B. animalis ssp. *lactis* 1	0,5	100,0	1,0	0,1	5,0	100,0	4,0	10,0	0,3
B. animalis ssp. *lactis* 2	0,5	150,0	1,0	0,7	5,0	150,0	4,0	10,0	0,5
B. angulatum	0,5	200,0	0,8	0,1	10,0	80,0	2,0	8,0	0,1
B. bifidum	0,3	150,0	2,0	2,0	2,0	100,0	2,5	8,0	0,2

Ap – ампициллин, Gm – гентамицин, Gr – грамицидин, Lm – линкомицин, Pen – пенициллин , Str – стрептомицин, Cm – хлорамфеникол, Tet – тетрациклин, Er –эритромицин

Положение, выносимое на защиту (2):

Штаммы бифидобактерий, выделенные из фекалий человека и животных, относятся к видам *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. longum*, *B. boum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, по технологическим свойствам соответствуют требованиям, предъявляемым к производственным штаммам, сопоставимы или превосходят штаммы, входящие в состав ряда пробиотиков и кисломолочных продуктов. Применение комплекса методов молекулярного типирования (ERIC-ПЦР, $(GTG)_5$-ПЦР, RAPD-ПЦР) позволяет выявить внутривидовые отличия выделенных культур бифидобактерий и дифференцировать их на уровне штаммов

B. bifidum БИМ В-525
B. adolescentis БИМ В-474

Последовательная адаптация к высокой кислотности среды культивирования

B. bifidum БИМ В-525-КУ
B. adolescentis БИМ В-474-КУ

Рисунок 10 – Выживаемость исследуемых штаммов бифидобактерий в модельных условиях желудка (pH 2,0, 180 мин)

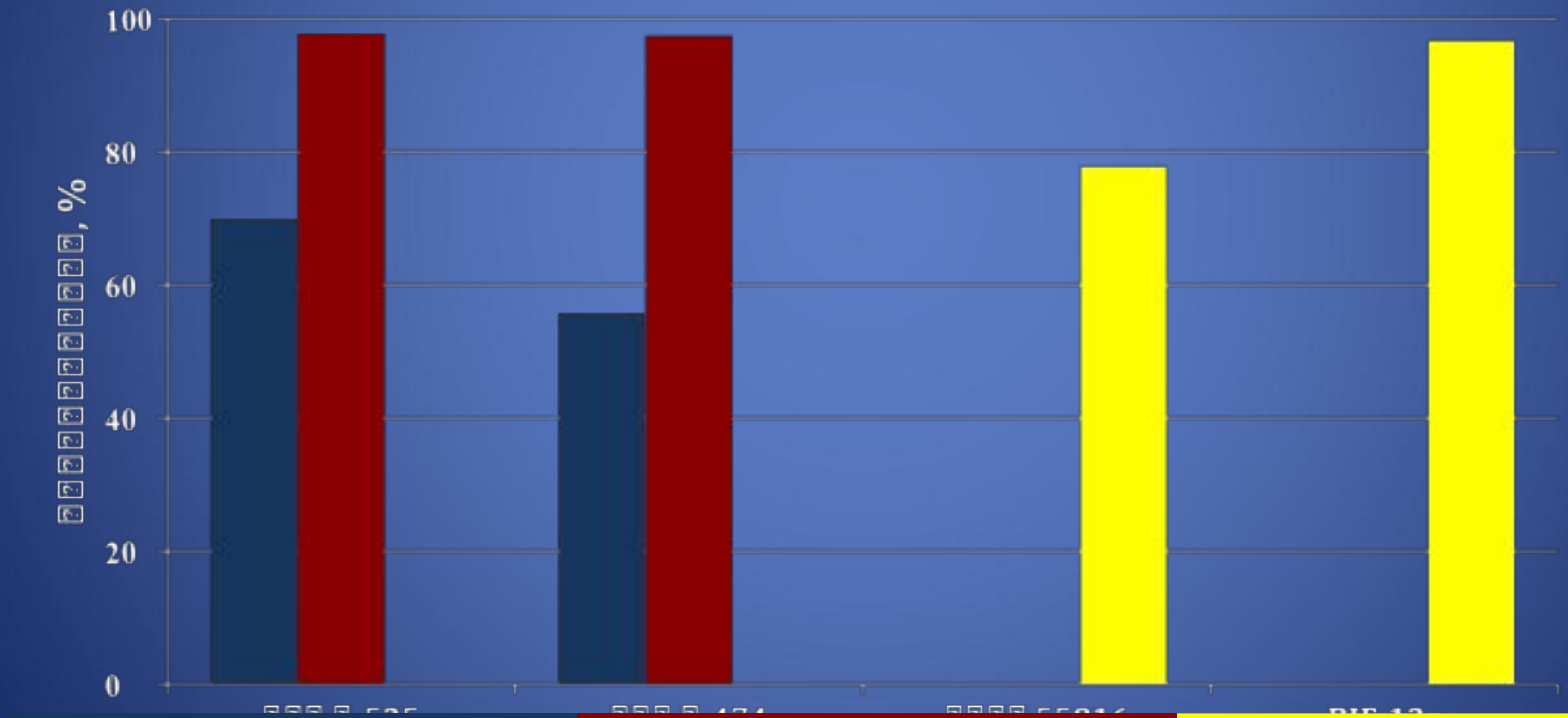


Рисунок 11 – Выживаемость бифидобактерий при хранении в питательной среде МРС-Б (а) и сквашенном молоке (б) при 4 °С

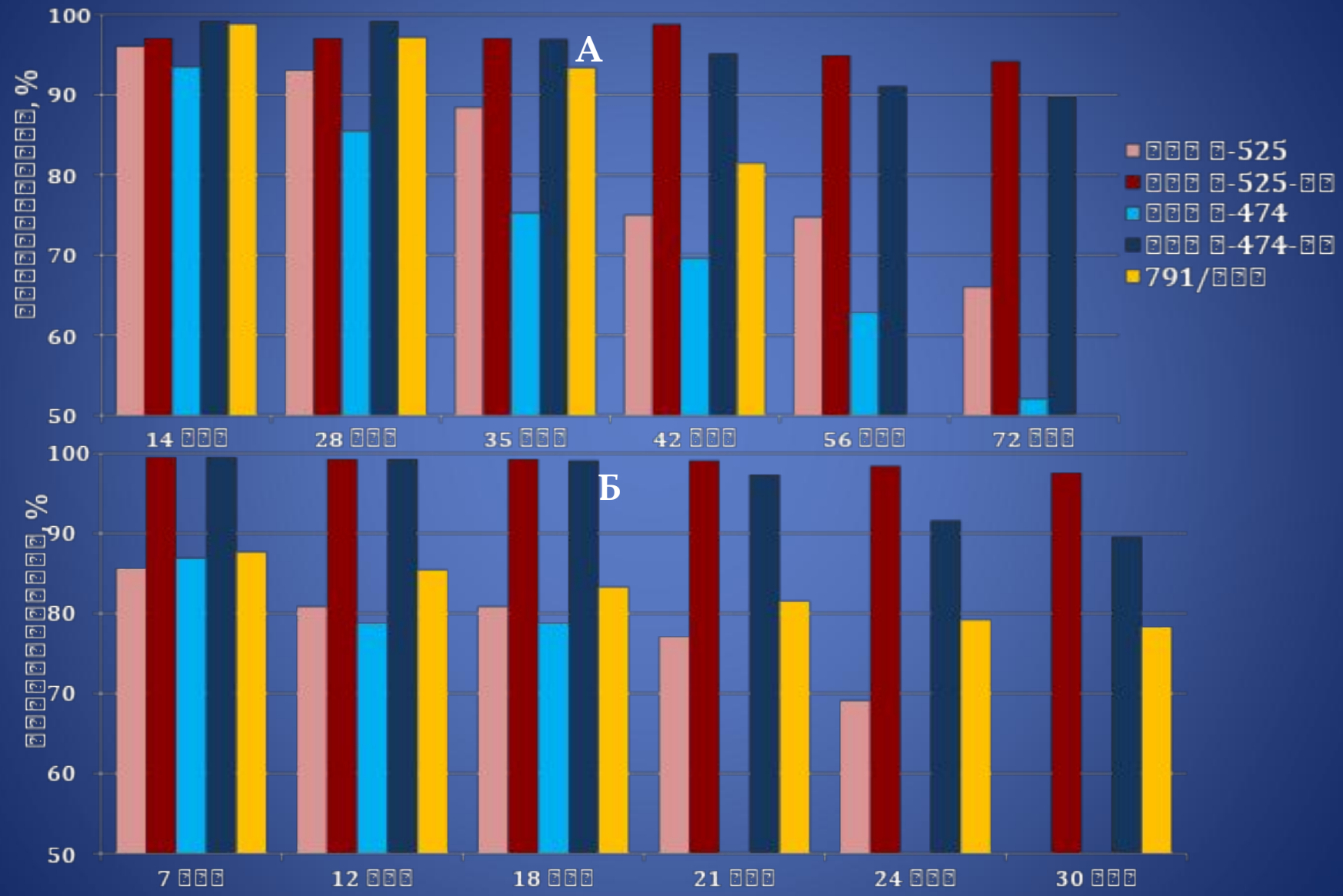
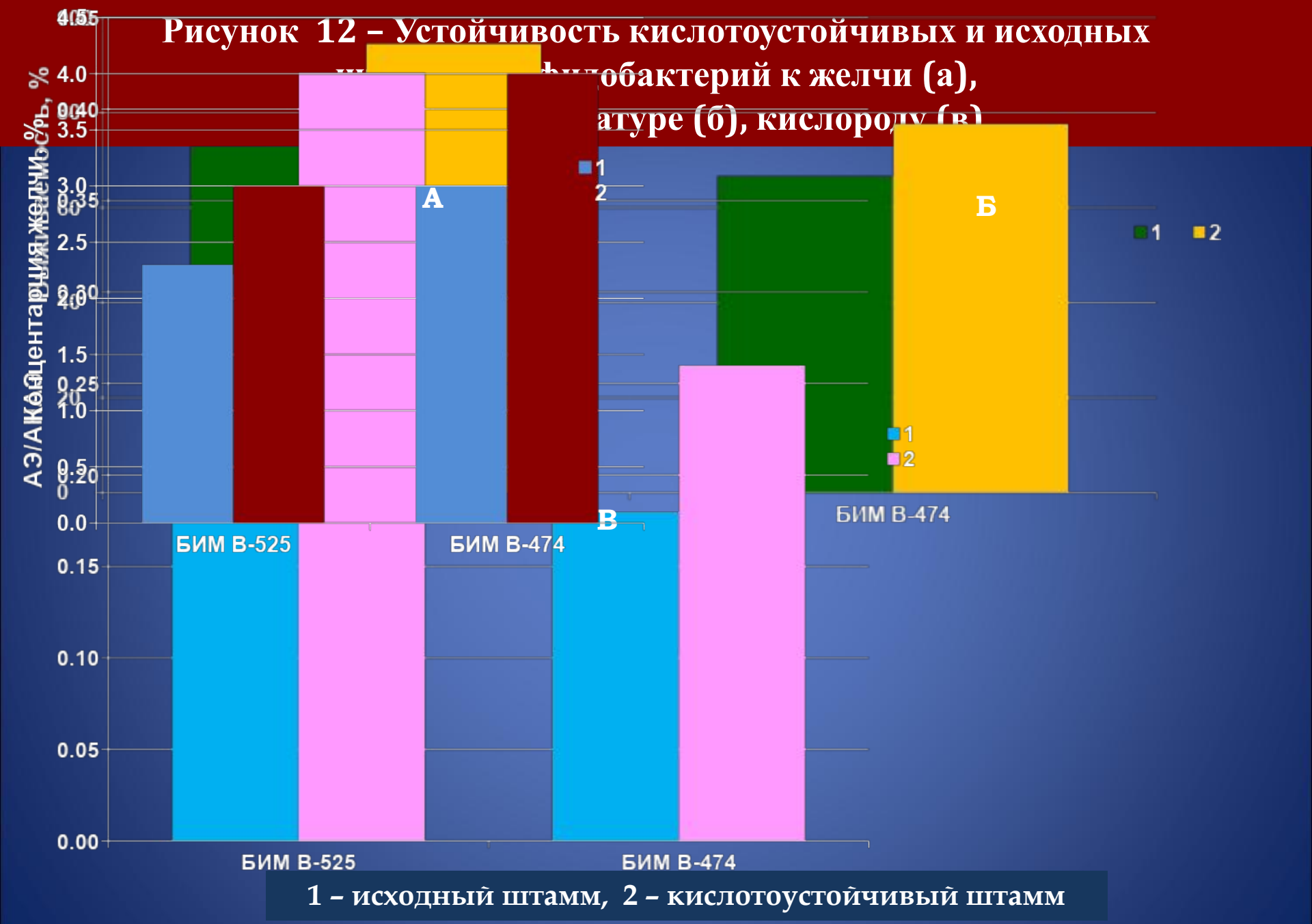


Рисунок 12 – Устойчивость кислотоустойчивых и исходных ш… бактерий к желчи (а), …атуре (б), кислороду (в)



1 – исходный штамм, 2 – кислотоустойчивый штамм

Положение, выносимое на защиту (3):

Кислотоустойчивые штаммы бифидобактерий *B. bifidum* БИМ В-465 Д и *B. adolescentis* БИМ В-462 Д, полученные методом адаптивной селекции, способны расти при pH 4,0, характеризуются высокой выживаемостью в модельных условиях желудка (95–99 %) и сопоставимы по этому признаку с лучшими зарубежными аналогами *B. longum* ATCC 55816, *B. longum* BIF12r, а по жизнеспособности при хранении (4 °C) превосходят лучший аналог *B. bifidum* 791/БАГ (на 11–19 %)

Рисунок 13 – Выживаемость бифидобактерий после криоконсервации

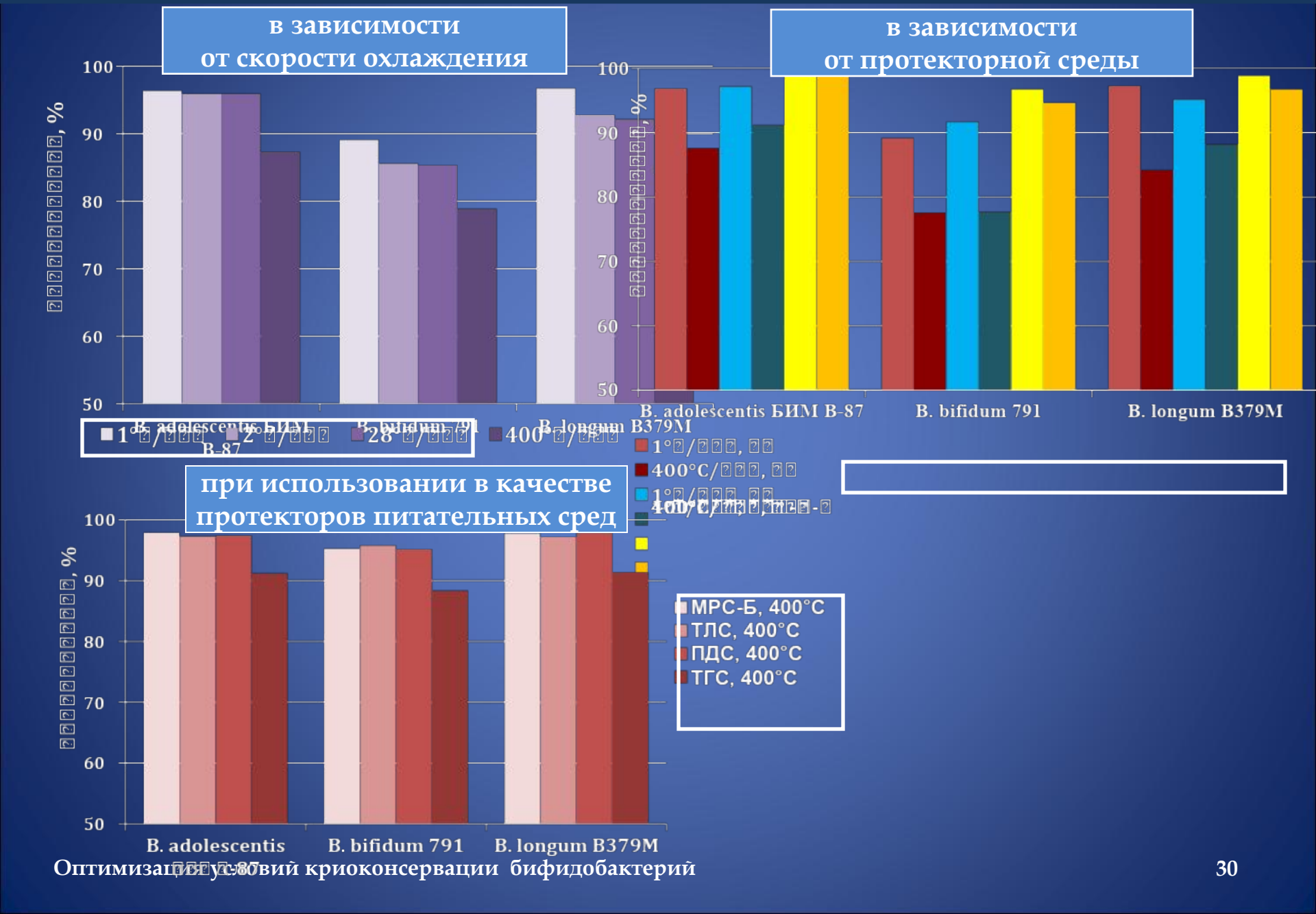
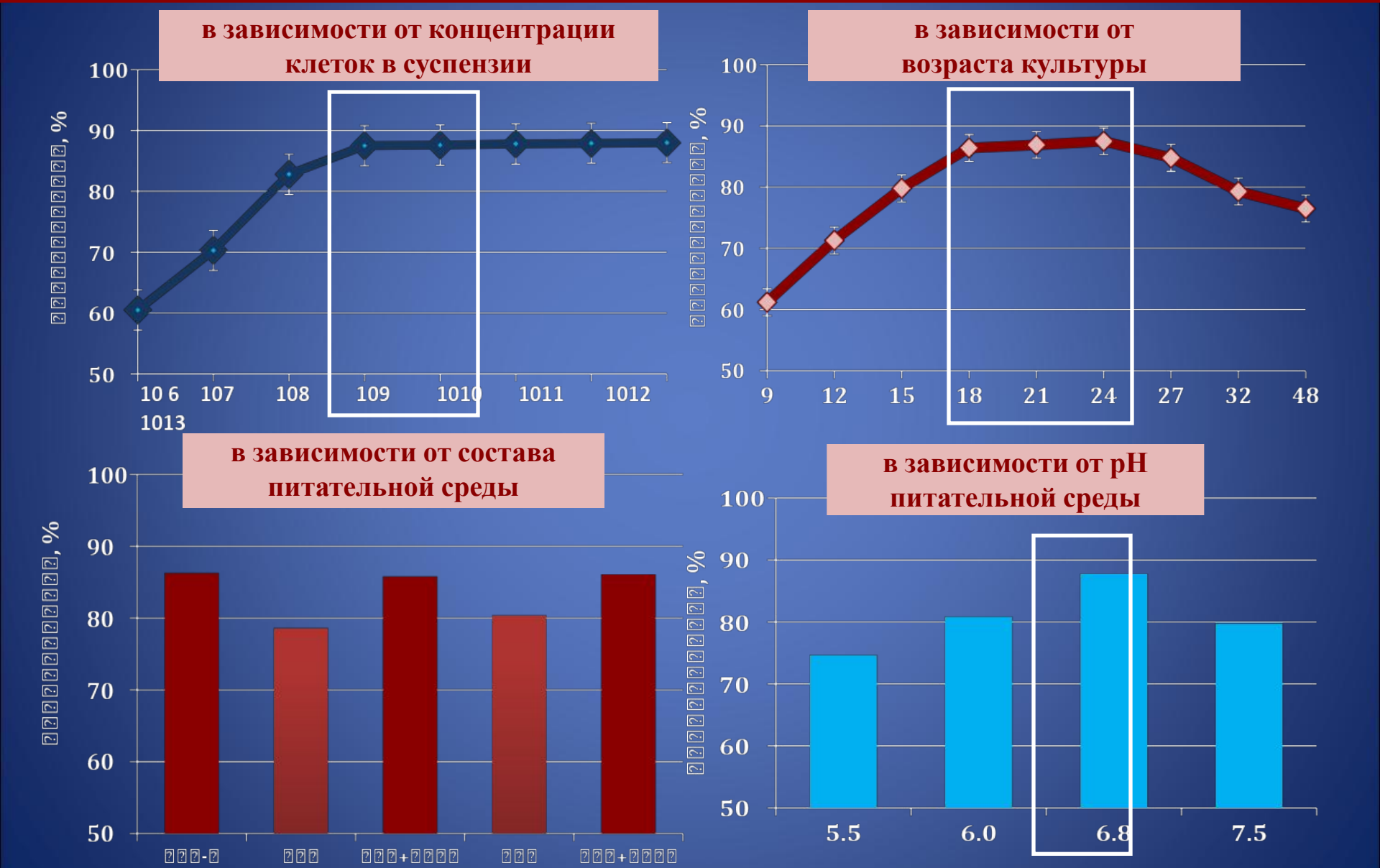


Рисунок 14 - Выживаемость бифидобактерий после криоконсервации



СПОСОБ КРИОКОНСЕРВАЦИИ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Культивирование бифидобактерий

Выращивание бактерий в жидкой питательной среде, содержащей твин-80, pH 6,8, при 37 °С в течение 18–24 ч (до достижения стационарной стадии роста)

Подготовка бифидобактерий к замораживанию

Осаждение клеток центрифугированием (10 000×g, 5 мин), их суспензирование в протекторной среде ($\geq 10^9$ клеток/мл), в качестве которой используется питательная среда МРС-Б, ТЛС или ПДС

Замораживание и хранение бифидобактерий

Замораживание бактериальной суспензии с быстрой скоростью охлаждения путем погружения в жидкий азот (400 °С/мин). Хранение в жидком азоте (-196 °С)

Оптимизация условий криоконсервации бифидобактерий

Рисунок 15 – Выживаемость бифидобактерий в течение при хранении методом криоконсервации

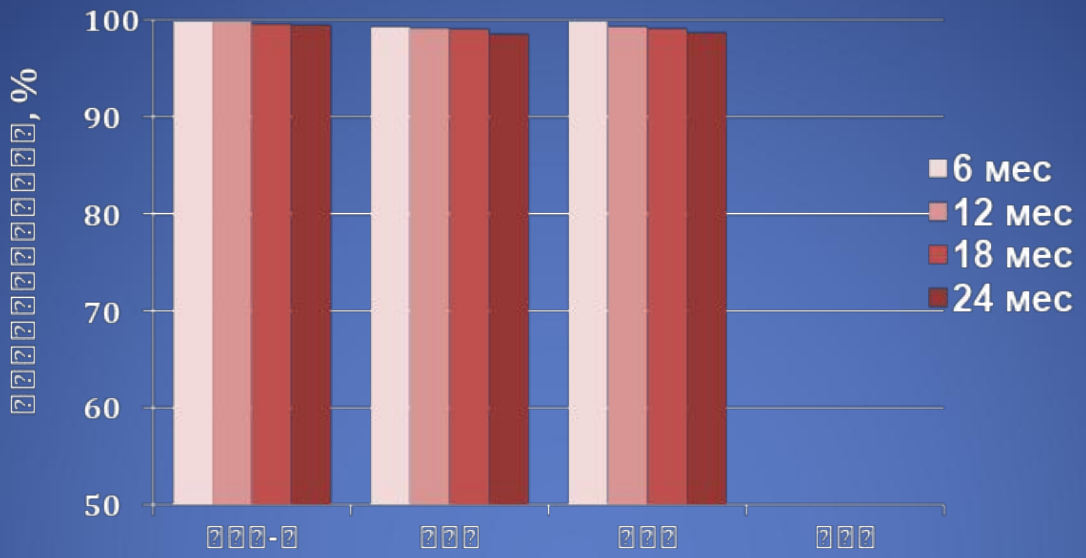


Рисунок 16 – Морфология клеток *B. adolescentis* БИМ В-87 после 2-х лет хранения методом криоконсервации

а, б, д, е– интактная культура;
в, г, ж, з – культура после криоконсервации;
а–г – электронная микроскопия (1×8 000 – 10 000);
д–з – световая микроскопия (1×2 000)

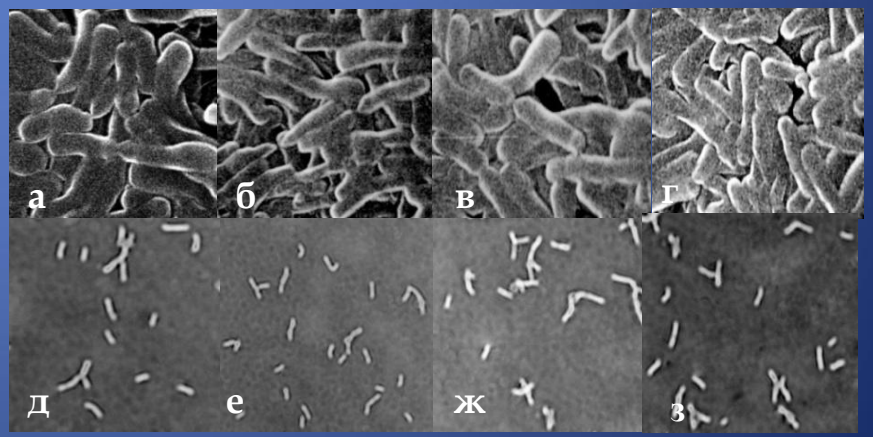


Рисунок 17 – Динамика развития *B. adolescentis* БИМ В-87 при глубинном культивировании в питательной среде МРС-Б после 2-х лет хранения методом криоконсервации

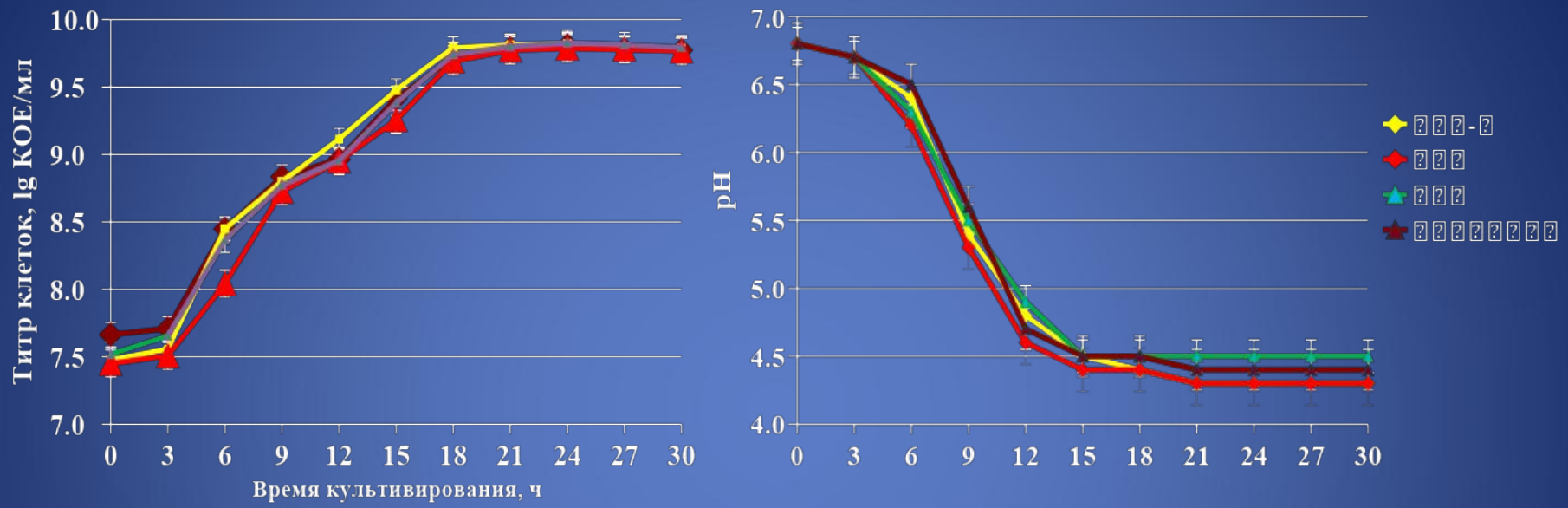
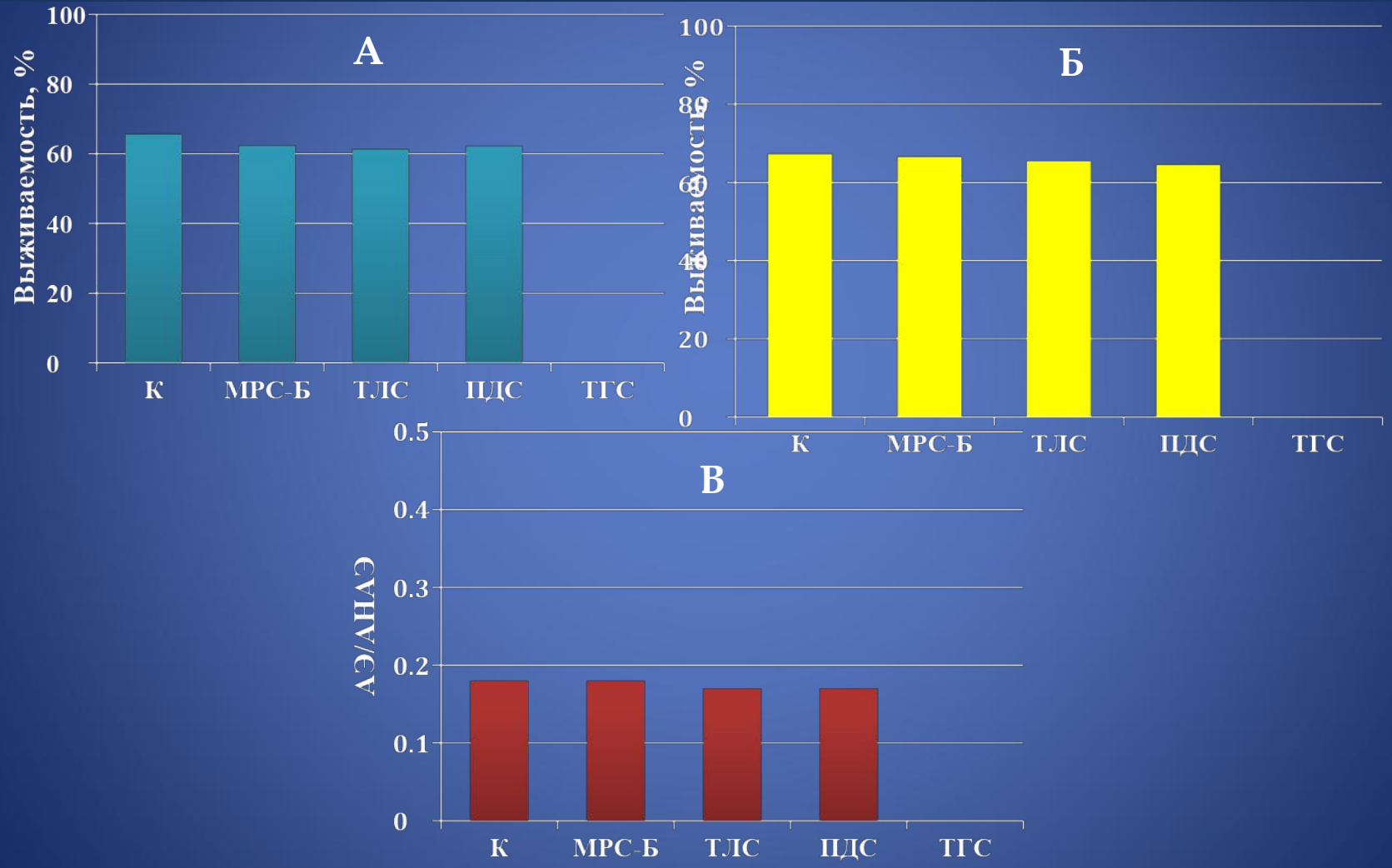


Таблица 11 – Рост *B. adolescentis* БИМ В-87 в коровьем молоке после 2-х лет хранения методом криоконсервации

Протекторная среда	Время сквашивания, ч	pH	Титр клеток, КОЕ/мл
Контроль	12	4,2±0,2	$5,8\pm1,2\times10^9$
МРС-Б	12	4,3±0,2	$5,6\pm2,1\times10^9$
ТЛС	12	4,2±0,2	$5,1\pm2,3\times10^9$
ПДС	12	4,3±0,2	$5,3\pm2,2\times10^9$

Рисунок 18 – Устойчивость *B. adolescentis* БИМ В-87 к условиям пищеварительного тракта (а), высокой температуре (б), кислороду (в) после 2-х лет хранения методом криоконсервации



Положение, выносимое на защиту (4):

Способ криоконсервации бифидобактерий, особенность которого состоит в использовании в качестве протекторов питательных сред МРС-Б, триптон-лактозной и пептонно-дрожжевой, является технологичным, обеспечивает 95–100 % выживаемость данных микроорганизмов, сохранение их морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств

Таблица 12 – Характеристика жидких пробиотиках, полученных на основе кислотоустойчивых штаммов *B. adolescentis* БИМ В-462 Д и *B. bifidum* БИМ В-465 Д и исходных коллекционных штаммов

Штамм бифидобактерий, входящий в состав пробиотика	Содержание живых клеток бифидобактерий в пробиотике, КОЕ/мл		
	0 сут	1 мес	3 мес
B. bifidum БИМ В-465 Д	$6,6\pm2,1\times10^{10}$	$6,2\pm1,8\times10^{10}$	$5,9\pm1,6\times10^{10}$
B. bifidum БИМ В-525	$3,2\pm1,6\times10^{10}$	$2,8\pm1,4\times10^{9}$	$4,1\pm1,2\times10^{7}$
B. adolescentis БИМ В-462 Д	$8,9\pm1,5\times10^{9}$	$8,3\pm1,9\times10^{9}$	$7,8\pm1,7\times10^{9}$
B. adolescentis БИМ В-474	$2,6\pm1,8\times10^{9}$	$9,5\pm3,8\times10^{7}$	$7,3\pm2,5\times10^{5}$

Таблица 13 – Характеристика кисломолочных продуктов, полученных на основе штаммов бифидобактерий *B. longum* БИМ В-647, *B. longum* БИМ В-648, *B. animalis* ssp. *lactis* БИМ В-643, *B. animalis* ssp. *lactis* БИМ В-645

Характеристика продукта	Штамм бифидобактерий			
	B. longum БИМ В-647	*B. longum* БИМ В-648	*B. animalis* ssp. *lactis* БИМ В-645	*B. animalis* ssp. *lactis* БИМ В-643
После изготовления				
Консистенция	однородная, в меру вязкая, без отделения сыворотки			
Вкус	чистый, кисломолочный, без посторонних привкусов			
Аромат	чистый, кисломолочный, без постороннего запаха			
Кислотность, pH	4,3±0,1	4,2±0,1	4,5±0,1	4,5±0,1
Титр клеток, КОЕ/мл	$3,2\pm2,1\times10^{10}$	$2,4\pm1,3\times10^{10}$	$2,6\pm1,8\times10^{9}$	$4,3\pm2,0\times10^{9}$
После 14 сут хранения (4 °С)				
Консистенция	однородная, в меру вязкая, без отделения сыворотки			
Вкус	чистый, кисломолочный, без посторонних привкусов			
Аромат	чистый, кисломолочный, без постороннего запаха			
Кислотность, pH	4,3±0,1	4,2±0,1	4,5±0,1	4,4±0,1
Титр клеток, КОЕ/мл	$8,4\pm2,2\times10^{7}$	$5,6\pm2,1\times10^{7}$	$7,3\pm2,8\times10^{8}$	$6,9\pm2,5\times10^{8}$

Таблица 14 – Показатели титра клеток и снижения pH среды, полученные при культивировании исследуемых штаммов бифидобактерий в соевом молоке

Штамм бифидобактерий	Титр клеток, КОЕ/мл		Кислотность, pH	
	0 ч	24 ч	0 ч	24 ч
B. adolescentis БИМ В-642	3,8±0,8×10^7	**7,3±0,3×10^8**	7,2±0,1	**4,9±0,1**
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-643	3,7±1,1×10^7	8,4±1,6×10^7	7,2±0,1	5,7±0,1
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-644	3,3±0,2×10^7	2,5±0,4×10^7	7,2±0,1	5,6±0,1
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-645	1,6±0,5×10^7	2,6±0,8×10^7	7,2±0,1	5,8±0,1
B. longum БИМ В-646	3,2±0,1×10^7	1,4±0,3×10^8	7,2±0,1	5,0±0,2
B. longum БИМ В-647	2,4±0,6×10^7	**2,0±0,2×10^8**	7,2±0,1	**4,9±0,1**
B. longum БИМ В-648	1,2±0,3×10^7	**4,4±0,4×10^8**	7,2±0,1	**4,2±0,1**

Рисунок 19 – Жизнеспособность исследуемых штаммов бифидобактерий при хранении в сквашенном соевом молоке (4 °С)

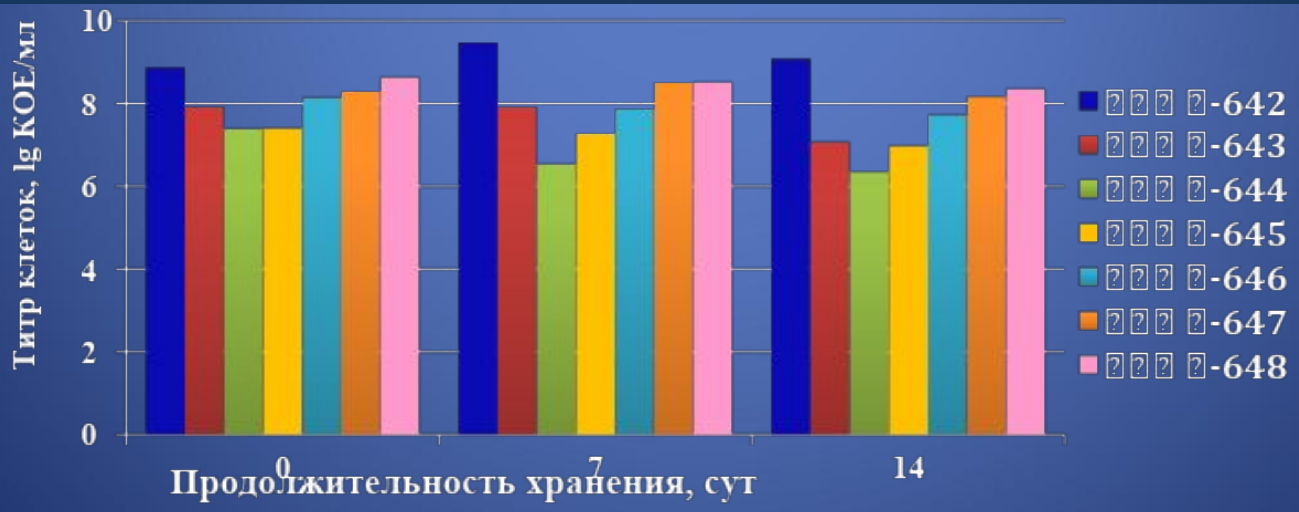


Таблица 15 – Показатели титра клеток и снижения pH среды, полученные при культивировании исследуемых штаммов бифидобактерий в морковном соке

Штамм бифидобактерий	Титр клеток, КОЕ/мл		Кислотность, pH	
	0 ч	18 ч	0 ч	18 ч
B. adolescentis БИМ В-642	$3,8±1,4×10^6$	$9,3±1,5×10^9$	5,7±0,1	3,4±0,2
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-643	$3,2±1,0×10^6$	$9,4±2,6×10^9$	5,7±0,1	3,5±0,1
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-644	$3,2±0,8×10^6$	$9,5±1,4×10^9$	5,7±0,1	3,4±0,1
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-645	$2,6±0,9×10^6$	$8,6±1,8×10^9$	5,7±0,1	3,4±0,2
B. longum БИМ В-646	$3,4±1,1×10^6$	$9,6±1,3×10^9$	5,7±0,1	3,5±0,2
B. longum БИМ В-647	$2,9±1,0×10^6$	$9,8±1,2×10^9$	5,7±0,1	3,4±0,1
B. longum БИМ В-648	$2,2±1,1×10^6$	$9,4±2,0×10^9$	5,7±0,1	3,5±0,1

Таблица 16 – Жизнеспособность исследуемых штаммов бифидобактерий при хранении в морковном соке (4 °С)

Штамм бифидобактерий	Продолжительность хранения			
	0 мес	1 мес	2 мес	3 мес
	Титр клеток, КОЕ/мл			
B. adolescentis БИМ В-642	$9,3±1,5×10^9$	$9,9±1,5×10^8$	$3,2±1,0×10^8$	$8,9±2,5×10^7$
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-643	$9,4±2,6×10^9$	$9,2±1,9×10^8$	$3,6±1,5×10^8$	$7,3±3,1×10^7$
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-644	$9,5±1,4×10^9$	$9,9±1,8×10^8$	$4,3±1,8×10^8$	$8,8±2,6×10^7$
B. animalis ssp. *lactis* БИМ В-645	$8,6±1,8×10^9$	$8,1±2,0×10^8$	$3,9±1,2×10^8$	$7,3±2,9×10^7$
B. longum БИМ В-646	$9,6±1,3×10^9$	$8,8±2,1×10^8$	$3,3±1,6×10^8$	$7,9±2,8×10^7$
B. longum БИМ В-647	$9,8±1,2×10^9$	$9,0±1,9×10^8$	$3,4±1,3×10^8$	$7,3±2,9×10^7$
B. longum БИМ В-648	$9,4±2,0×10^9$	$8,6±2,2×10^8$	$2,9±1,7×10^8$	$7,0±2,2×10^7$

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

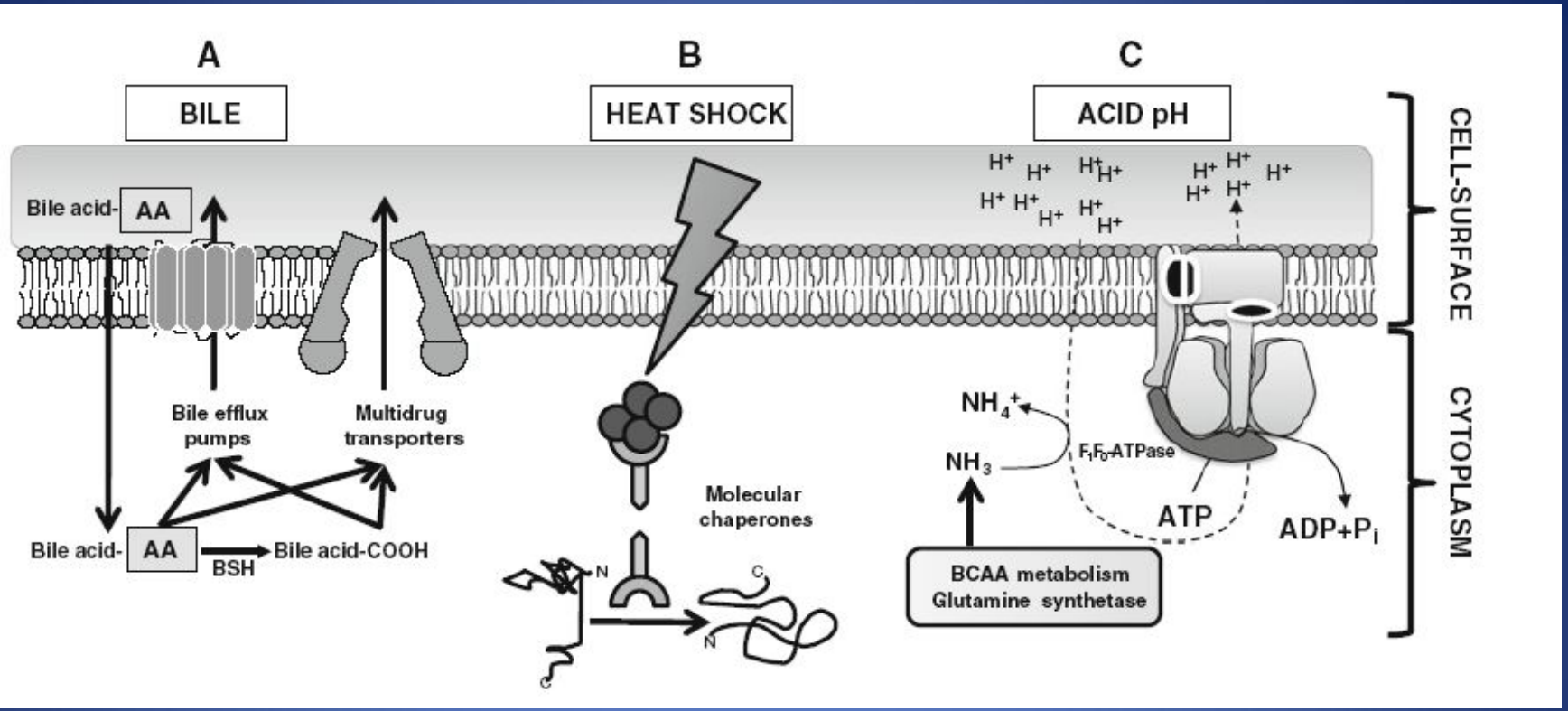
МЕХАНИЗМЫ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИФИДОБАКТЕРИЙ
Продукция органических кислот
Продукция низкомолекулярных соединений
Продукция бактериоцинов и бактериоцин-подобных веществ
Конкуренция за пищевые субстраты и сайты адгезии на слизистой кишечника

Биологически активные вещества, продуцируемые бифидобактериями

- органические кислоты;
- бактериоцины и бактериоцин-подобные вещества;
- низкомолекулярные вещества;
- витамины;
- аминокислоты;
- пурины и пиримидины;
- гидролитические ферменты, расщепляющие сложные углеводы;
- внеклеточные полисахариды

Механизмы адаптации бифидобактерий к неблагоприятным внешним условиям

Стресс	Механизм адаптации
Окислительный стресс	Активация ферментов антиоксидантной защиты. Модификация клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Синтез белка Omp.
Тепловой стресс	Синтез молекулярных шаперонов (GroEL, GroES, GrpE, DnaJ, DnaK, ClpB), обеспечивающих правильный фолдинг белков. Синтез протеаз (ClpC, ClpP), участвующих в деградации поврежденных и неправильно собранных белков.
Кислотный стресс	Активация F_0-F_1-АТФазы, обеспечивающей удаление протонов водорода из клетки. Образование аминокислот с разветвленной цепью и их последующее дезаминирование. Синтез молекулярных шаперонов и протеаз.
Желчь	Активация трансмембранных белков-транспортеров Ctr, BetA. Активация гидролазы желчных кислот (BSH). Модификация ципоплазматической мембраны, снижение её проницаемости для желчи. Синтез молекулярных шаперонов и протеаз.



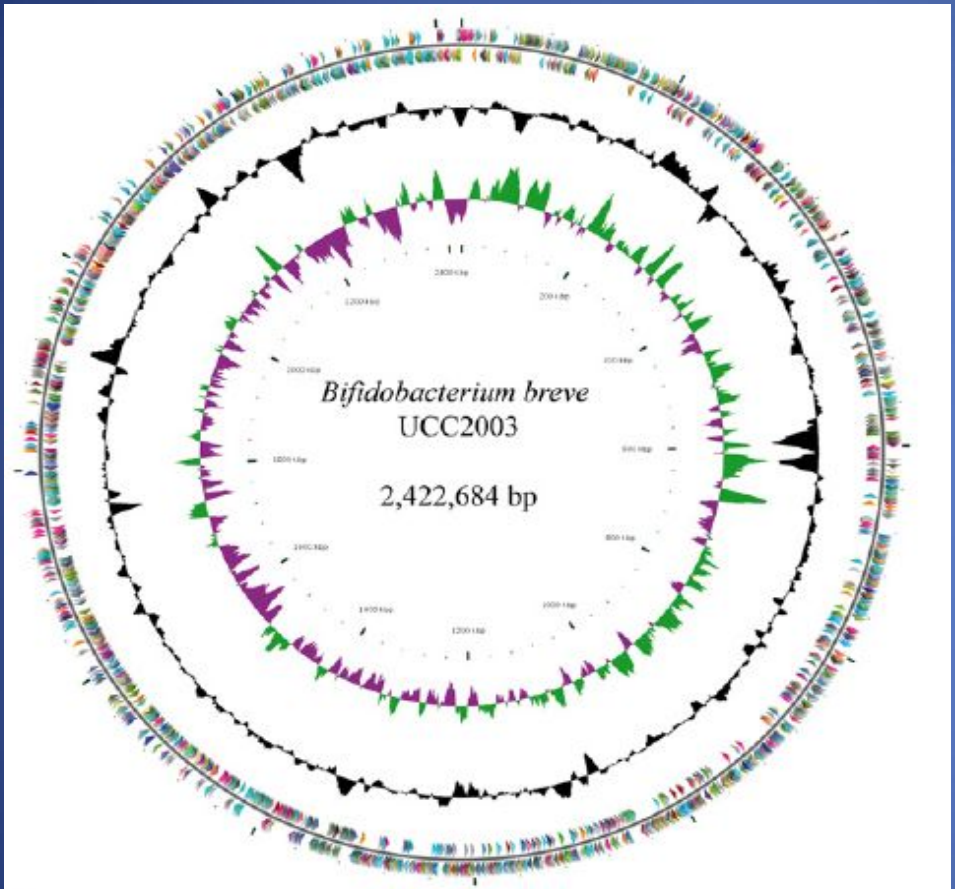
Ruiz L et al., Genes Nutr. 2011.

Общая характеристика геномов бифидобактерий

Species	Genome size (bp)	G+C content (mol%)	No. genes	No. tRNA genes	No. rRNA loci	No. IS elements	Origin	GenBank accession no.	Status
B. adolescentis ATCC15703	2 089 645	60	1631	54	5	5	Human GIT	NC_008618	C
B. animalis subsp. *lactis* AD011	1 933 695	60.5	1528	52	2	1	Infant faeces	NC_011835	C
B. animalis subsp. *lactis* Bl-04	1 938 709	60	1631	52	4	6	Infant faeces	NC_012814	C
B. animalis subsp. *lactis* DSM10140	1 938 483	60	1629	51	4	6	Infant faeces	NC_012815	C
B. dentium Bd1	2 636 368	59	2278	55	4	7	Dental caries	NC_013714	C
B. longum subsp. *infantis* ATCC15697	2 832 748	60	2498	79	4	26	Infant faeces	NC_011593	C
B. longum subsp. *longum* DJO10A	2 375 792	60	1990	58	4	44	Human GIT	NC_010816	C
B. longum subsp. *longum* NCC2705	2 256 640	60	1727	57	4	46	Human GIT	NC_004307	C
B. longum subsp. *longum* JDM301	2 477 838	60	2035	55	3	ND	Human GIT	CP002010	C
B. gallicum DSM20093	2 019 802	57	1980	ND	ND	ND	Human GIT	ABXB00000000	UC
B. pseudocatenulatum DSM20438	2 304 808	56	2151	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABXX00000000	UC
B. catenulatum DSM16992	2 058 429	56	2011	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABXY00000000	UC
B. bifidum NCIM41171	2 186 140	62	1811	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABQP00000000	UC
B. angulatum DSM20098	2 007 108	59	1811	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABYS00000000	UC

Bottacini F. et al., Microbiology, 2010.

Геном ***Bifidobacterium breve*** UCC2003



A RNA processing and modification
B Chromatin Structure and dynamics
J Translation
K Transcription
L Replication and repair
D Cell cycle control and mitosis
O Post-translational modification, protein turnover
M Cell wall/membrane/envelop biogenesis
N Cell motility
P Inorganic ion transport and metabolism
T Signal Transduction
U Intracellular trafficking and secretion
V Defense mechanisms

W Extracellular structures
Y Nuclear structure
Z Cytoskeleton
C Energy production and conversion
G Carbohydrate metabolism and transport
E Amino Acid metabolism and transport
F Nucleotide metabolism and transport
H Coenzyme metabolism
I Lipid metabolism
Q Secondary Structure
R General Functional Prediction only
S Function Unknown
X No prediction

Motherway et al., Microbiology, 2011