

**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 фосфокестолаза

Бифидобактерии – представители симбиотической микрофлоры кишечника человека и животных

95 % микрофлоры
кишечника здорового
младенца

Доминирующие виды:

B. bifidum, *B. breve*,
B. infantis, *B. longum*

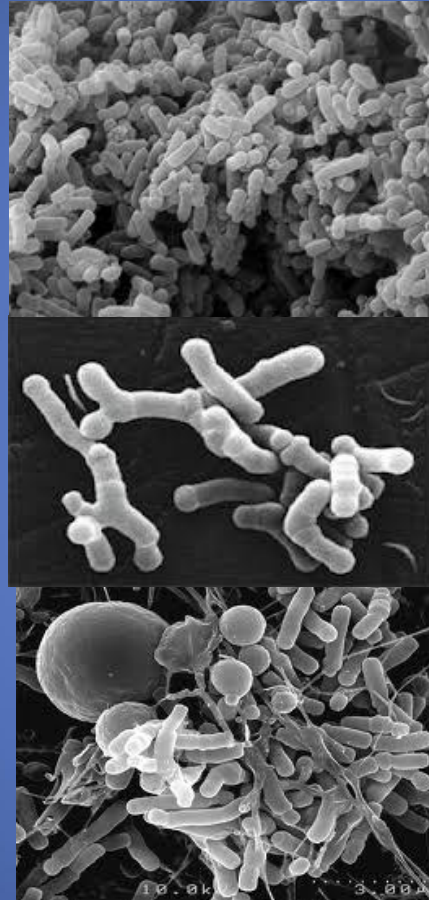
25 % анаэробной
микрофлоры кишечника
здорового взрослого

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

❖ Коррекция дисбиотических состояний кишечника

❖ Улучшение обмена веществ, коррекция гиперхолестеринемии

❖ Комплексная терапия инфекционных заболеваний

❖ Стимуляция иммунной системы

❖ 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

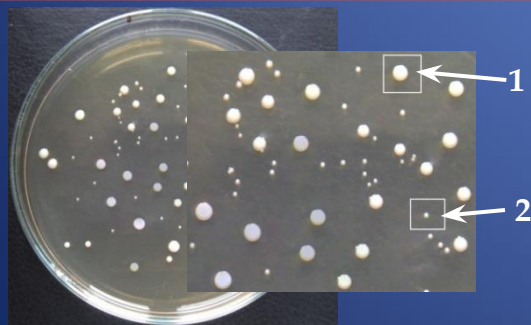
среда де Мана, Рогозы, Шарпа -
МРС-Б
 тиогликолевая среда - ТГС
 среда для анаэробов - МСК

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	ЛП А	ГЖ	ГЖ А	К	ЛП	ЛП А	ГЖ	ГЖА	К	ЛП	ЛП А	ГЖ	ГЖА
<i>B. bifidum</i> 791	10 ^{-8**}	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-***	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	-	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	-
<i>B. bifidum</i> ЛВА-3	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	-	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	-
<i>B. adolescentis</i> 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
<i>B. adolescentis</i> ВКПМ Ас-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
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> ВКПМ Ас-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
<i>B. longum</i> В379М	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	-	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	-
<i>L. fermentum</i> БИМ В-449	10 ⁻⁸	-	-	-	-	10 ⁻⁸	-	-	-	-	10 ⁻⁸	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> БИМ В-447	10 ⁻⁸	-	-	-	-	10 ⁻⁸	-	-	-	-	10 ⁻⁸	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> БИМ В-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
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> БИМ В-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
<i>S. thermophilus</i> БИМ В-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
<i>E. faecalis</i> БИМ В-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
Примечания - К* - контроль, 10 ^{-8**} - последнее разведение, при высеве которого формировались изолированные колонии (<10 на чашку), -*** - отсутствие роста															
<i>E. coli</i> БИМ В-379	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	10 ⁻⁸	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	10 ⁻⁸	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	-	-	-

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	<i>Lactobacillus</i>
	крупные полупрозрачные с неровным краем и выпуклым белым центром		
	мелкие сероватые округлые блестящие выпуклые	28-30	<i>Lactococcus</i>
	крупные желтые блестящие с выпуклым центром		
	крупные белые блестящие округлые		
	мелкие белые блестящие выпуклые округлые		
МСК-ЛПА	мелкие округлые прозрачные выпуклые	0-2	<i>Lactobacillus</i>
	крупные полупрозрачные с неровным краем и выпуклым белым центром		
	крупные округлые белые блестящие выпуклые	80	<i>Bifidobacterium</i>
	мелкие округлые белые блестящие выпуклые	18-20	<i>Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus</i>



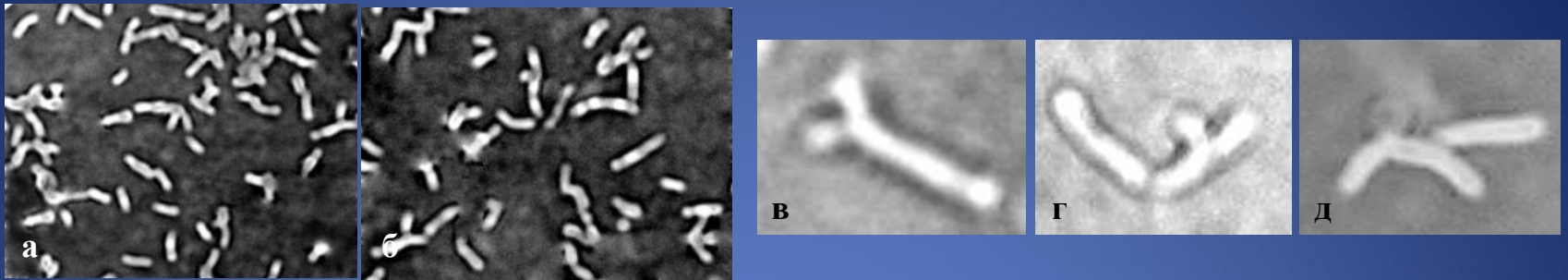
1 – колонии бифидобактерий,
2 – колонии молочнокислых кокков
Рисунок 1 – Морфология колоний, сформировавшихся на среде МСК-ЛПА, при посеве фекалий человека



Положение, выносимое на защиту (1):

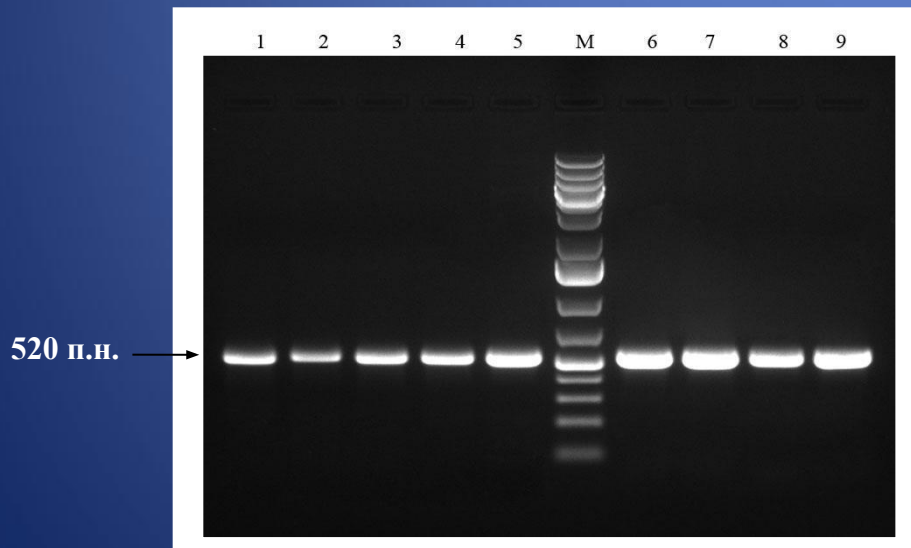
Питательная среда для выделения бифидобактерий на основе среды для анаэробов с добавлением селективных компонентов – хлорида лития, пропионата натрия и азидата натрия, обеспечивает преимущественный рост представителей рода *Bifidobacterium* и позволяет дифференцировать их от молочнокислых бактерий

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 Vif-164-f и Vif-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	<i>Bifidobacterium</i> sp. Н1, Н2, Н3, В3, А4, А6, И1
Фекалии коз	<i>Bifidobacterium</i> sp. КО3, КО4, 4
Фекалии коров	<i>Bifidobacterium</i> sp. Д1, Д3, Д4
Фекалии свиней	<i>Bifidobacterium</i> sp. С6, 6
Фекалии кур	<i>Bifidobacterium</i> sp. К3, К4

КРИТЕРИИ ОТБОРА БИФИДОБАКТЕРИЙ

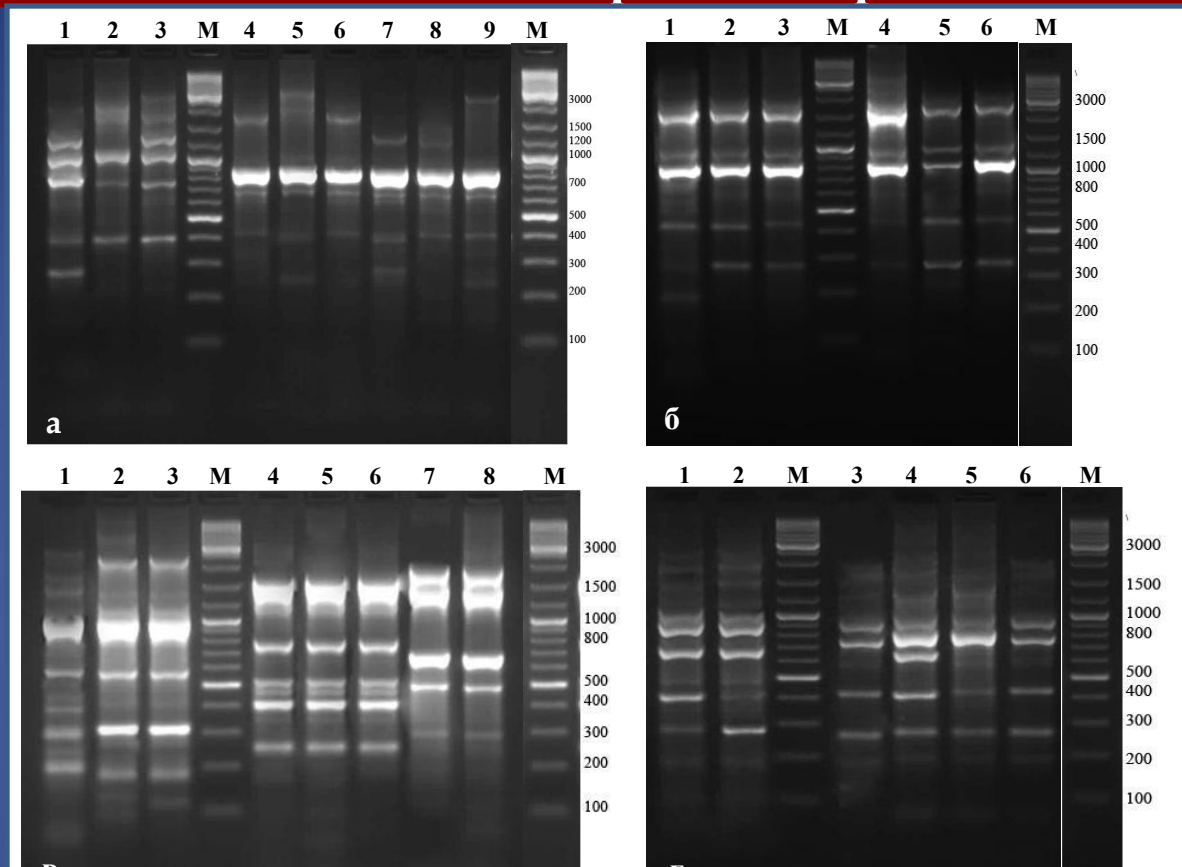
- ❖ жизнеспособность и стабильность фенотипических признаков при лабораторном культивировании;
- ❖ интенсивный рост в искусственных питательных средах;
- ❖ способность к росту в микроаэрофильных условиях

Таблица 5 – Результаты видовой идентификации бифидобактерий методом двухлокусного секвенирования

Штамм	Видовая принадлежность	
	ген 16S рРНК	ген трансальдолазы (<i>tal</i>)
<i>Bifidobacterium</i> sp. Н1	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. Н2	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. Н3	<i>B. longum</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. А4	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. А6	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. В3	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. И1	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. К3	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. К4	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. 6	<i>B. boum</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. С6	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. КО3	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. КО4	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. 4	<i>B. thermophilum</i>	<i>B. thermophilum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. Д1	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. Д3	<i>B. boum</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp. Д4	<i>B. boum</i>	<i>B. animalis</i> / <i>bifidum</i> / <i>breve</i> / <i>longum</i>

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-11, 3 – И1, *B. longum ssp. longum*: 4 – ВКПМ Ac-1665, *B. longum ssp. infantis*: 5 – ВКПМ Ac-1732, *B. longum*: 6 – Н3, 7 – А4, 8 – В3, 9 – БИМ В-521;

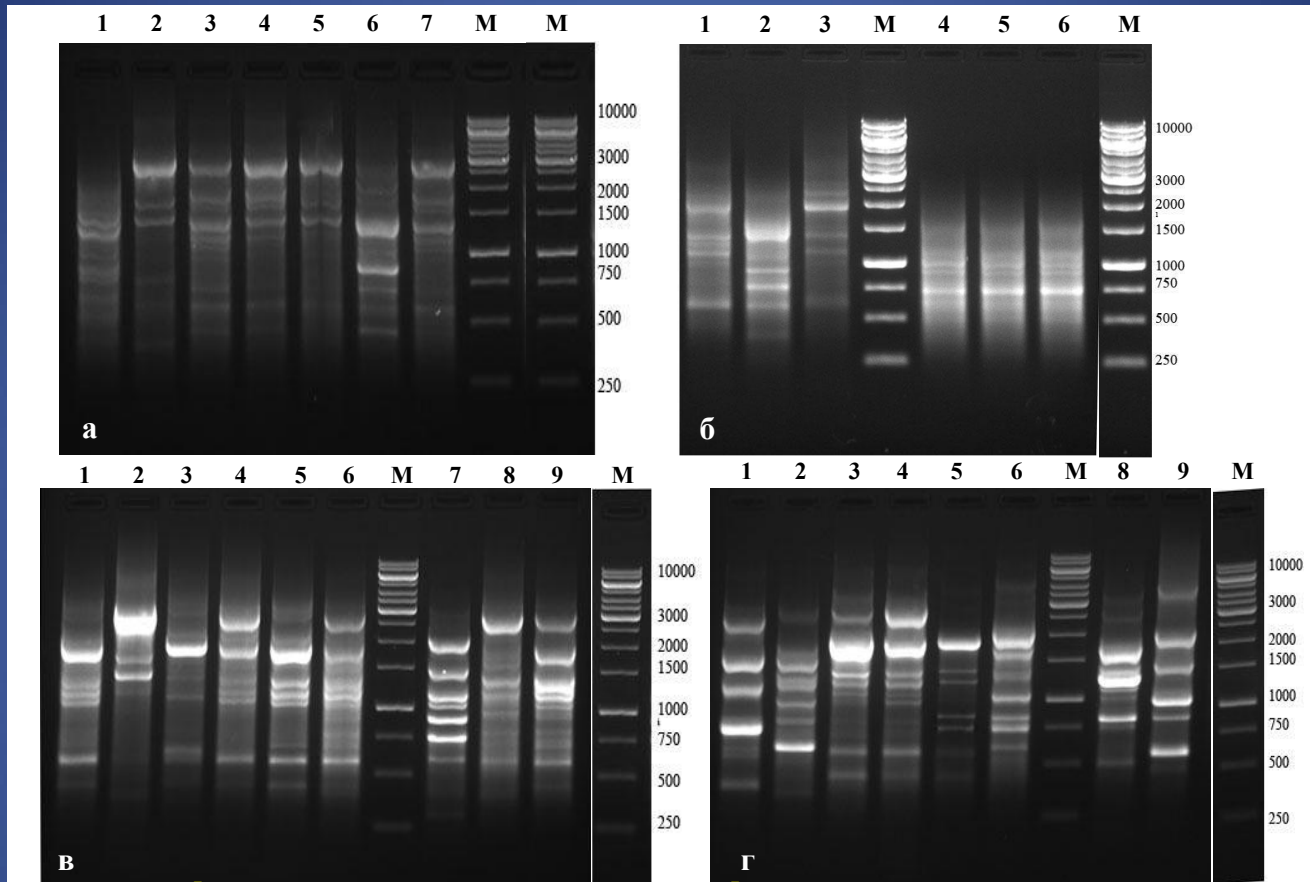
б) *B. animalis ssp. lactis*: 1 – ВКПМ Ac-1663, 2 – БИМ В-522, 3 – БИМ В-523,

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

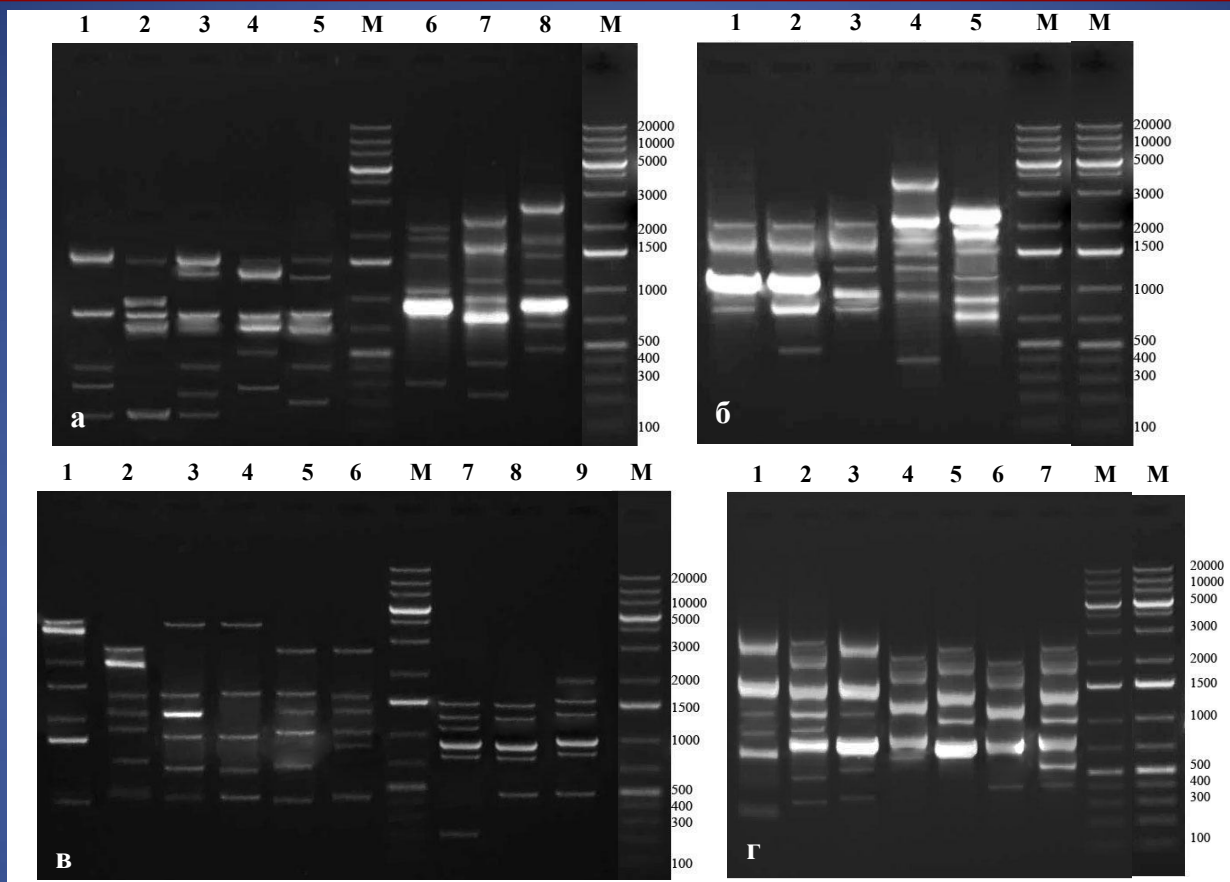


а) *B. longum ssp. longum* : 1 – ВКПМ Ас-1663, *B. longum* : 2 – В379М, 3 – Н3, 4 – А4, 5 – В3, *B. longum ssp. infantis*: 6 – ВКПМ Ас-1732, 7 – БИМ В-521; б) *B. adolescentis* : 1 –ВКПМ Ас-1662, 2 – ГО-13, 3 – Н1, *B. boum* 4 – 6, 5 – Д3, 6 – Д4; в) *B. animalis ssp. lactis*: 1 –ВКПМ Ас-1663, 2 – БИМ В-522, 3 – БИМ В-523, 4 –Н2, 5 – А6, 6 – И1, *B. pseudolongum ssp. globosum* : 7 –ВКПМ Ас-1752, 8 – С6, 9 – К4; д) *B. animalis ssp. animalis* : 1 –ВКПМ Ас-1693, 2 –ВКПМ Ас-1747, 3 – К3, 4 – К03, 5 – К04, 6 – Д1, *B. thermophilum*: 7 –ВКПМ Ас-1746, 8 – 4,

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

Выделение и идентификация бифидобактерий

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



а) *B. animalis ssp. lactis*: 1 – ВКПМ Ac-1693, 2 – БИМ В-522, 3 – БИМ В-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 В-521, 5 – Н3, 6 – В3, 7 – А4,

М – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler Ladder Mix (Fermentas)

Выделение и идентификация бифидобактерий

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 кишечной микрофлоры

Чувствительность к антибиотикам, включенным в перечень Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA), отсутствие внехромосомных генетических элементов (плазмид)

Таблица 6 – Показатели титра клеток и снижения рН 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	рН	титр клеток, КОЕ/мл	рН
ВЫДЕЛЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ				
<i>B. adolescentis</i> Н1	1,1±0,2×10 ¹⁰	4,7±0,3	1,0±0,3×10 ¹⁰	4,6±0,3
<i>B. longum</i> Н3	1,2±1,1×10 ¹⁰	4,6±0,3	1,3±0,3×10 ¹⁰	4,6±0,3
<i>B. longum</i> В3	1,1±0,3×10 ¹⁰	4,1±0,2	1,4±0,2×10 ¹⁰	4,0±0,2
<i>B. longum</i> А4	1,6±0,3×10 ¹⁰	4,4±0,3	1,2±0,3×10 ¹⁰	4,3±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Н2	1,8±0,2×10 ¹⁰	4,3±0,2	1,6±0,4×10 ¹⁰	4,2±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> А6	1,2±0,1×10 ¹⁰	4,2±0,3	1,8±0,3×10 ¹⁰	4,1±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> И1	1,8±0,3×10 ¹⁰	4,3±0,2	1,6±0,3×10 ¹⁰	4,3±0,2
<i>B. pseudolongum</i> С6	1,3±0,2×10 ¹⁰	4,5±0,3	1,5±0,2×10 ¹⁰	4,5±0,1
<i>B. pseudolongum</i> К4	1,1±0,4×10 ¹⁰	4,5±0,2	1,4±0,3×10 ¹⁰	4,5±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> К3	1,5±0,3×10 ¹⁰	4,2±0,2	1,6±0,2×10 ¹⁰	4,2±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> КО3	1,6±0,3×10 ¹⁰	4,4±0,2	1,4±0,3×10 ¹⁰	4,3±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> КО4	1,8±0,4×10 ¹⁰	4,3±0,3	2,0±1,0×10 ¹⁰	4,3±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> Д1	6,0±2,2×10 ⁹	4,4±0,3	1,1±0,3×10 ⁹	4,4±0,1
<i>B. boum</i> Д3	8,1±3,1×10 ⁹	4,7±0,2	1,3±0,3×10 ⁹	4,7±0,3
<i>B. boum</i> Д4	7,6±2,0×10 ⁹	4,6±0,2	1,2±0,2×10 ⁹	4,5±0,3
<i>B. boum</i> 6	1,5±0,2×10 ¹⁰	4,6±0,2	1,5±0,3×10 ¹⁰	4,6±0,3
<i>B. thermophilum</i> 4	1,2±0,3×10 ¹⁰	4,8±0,1	1,4±0,3×10 ¹⁰	4,9±0,2
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ				
<i>B. longum</i>	8,0±2,1×10 ⁸	4,7±0,2	1,0±2,0×10 ⁸	4,6±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	9,4±3,2×10 ⁹	4,6±0,2	1,1±0,3×10 ¹⁰	4,7±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	1,2±0,2×10 ¹⁰	4,6±0,2	1,5±0,3×10 ¹⁰	4,5±0,2
<i>B. angulatum</i>	9,2±0,3×10 ⁹	4,1±0,3	2,0±1,0×10 ⁹	4,1±0,1
<i>B. bifidum</i>	2,2±1,4×10 ¹⁰	3,9±0,3	5,0±2,0×10 ¹⁰	3,9±0,2

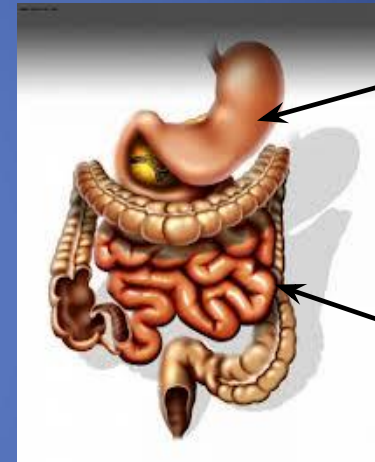
Таблица 7 – Время сквашивания, показатели титра клеток и снижения рН среды, полученные при культивировании выделенных и референтных штаммов бифидобактерий в коровьем молоке

Штамм	Показатель		
	время сквашивания, ч	титр клеток, КОЕ/мл	рН
ВЫДЕЛЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ			
<i>B. adolescentis</i> Н1	26	8,2±2,1×10 ^{8*}	4,9±0,2
<i>B. longum</i> Н3	15	3,5±1,0×10 ⁹	4,9±0,2
<i>B. longum</i> В3	12	1,4±0,3×10 ¹⁰	4,3±0,2
<i>B. longum</i> А4	12	2,2±1,6×10 ¹⁰	4,8±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Н2	14	3,4±2,0×10 ⁹	4,8±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> А6	15	1,8±0,3×10 ¹⁰	4,8±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> И1	17	9,1±1,3×10 ⁹	4,9±0,3
<i>B. pseudolongum</i> С6	-**	5,2±2,1×10 ⁷	6,4±0,1
<i>B. pseudolongum</i> К4	32	3,4±1,1×10 ⁸	4,4±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> К3	32	6,2±2,5×10 ⁸	4,3±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> КО3	26	4,0±1,4×10 ⁸	4,6±0,2
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> КО4	30	2,4±1,2×10 ⁸	4,2±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> Д1	26	5,3±2,6×10 ⁸	4,2±0,1
<i>B. boum</i> Д3	36	3,1±1,4×10 ⁸	4,6±0,2
<i>B. boum</i> Д4	-	4,4±2,0×10 ⁷	6,7±0,1
<i>B. boum</i> 6	28	5,2±3,0×10 ⁸	4,4±0,3
<i>B. thermophilum</i> 4	-	4,5±2,1×10 ⁷	6,7±0,1
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ			
<i>B. longum</i>	18	7,3±2,2×10 ⁸	4,2±0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	10	7,1±3,5×10 ⁹	3,9±0,1
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	10	8,4±3,2×10 ⁹	3,9±0,1
<i>B. angulatum</i>	-	3,3±1,7×10 ⁷	6,3±0,2
<i>B. bifidum</i>	10	5,2±2,3×10 ⁹	4,4±0,1
Примечание - * - титр клеток и рН 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				
<i>B. adolescentis</i> Н1	1,2±0,3×10 ⁹	5,3±2,4×10 ⁷	8,0±2,1×10 ⁸	4,4±2,2×10 ⁶
<i>B. longum</i> Н3	1,2±0,1×10 ¹⁰	8,2±4,3×10 ⁸	3,5±1,3×10 ⁹	3,1±1,6×10 ⁶
<i>B. longum</i> В3	1,1±0,3×10 ¹⁰	6,0±3,4×10 ⁸	1,4±0,3×10 ¹⁰	6,3±4,1×10 ⁷
<i>B. longum</i> А4	1,5±0,2×10 ¹⁰	9,5±5,2×10 ⁷	2,2±1,5×10 ¹⁰	7,5±5,1×10 ⁷
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Н2	1,8±0,2×10 ¹⁰	3,3±1,5×10 ⁸	3,8±2,6×10 ⁹	6,2±3,7×10 ⁸
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> А6	1,2±0,1×10 ¹⁰	1,2±0,2×10 ⁸	1,8±0,4×10 ¹⁰	1,5±0,2×10 ⁸
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> И1	1,8±0,3×10 ¹⁰	7,3±4,1×10 ⁷	9,5±1,8×10 ⁹	5,3±3,2×10 ⁷
<i>B. pseudolongum</i> С6	1,3±0,2×10 ¹⁰	3,6±2,8×10 ⁸	-	-
<i>B. pseudolongum</i> К4	1,1±0,4×10 ¹⁰	5,4±3,3×10 ⁷	3,2±1,9×10 ⁸	2,8±1,0×10 ⁶
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> К3	1,5±0,3×10 ¹⁰	4,6±2,2×10 ⁷	6,6±2,7×10 ⁸	4,5±3,0×10 ⁶
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> КО3	1,6±0,3×10 ¹⁰	6,6±3,1×10 ⁷	4,0±1,8×10 ⁸	5,4±4,2×10 ⁶
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> КО4	1,8±0,4×10 ¹⁰	5,8±2,9×10 ⁷	2,6±1,1×10 ⁸	2,0±1,1×10 ⁶
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> Д1	6,2±2,0×10 ⁹	2,0±1,3×10 ⁷	5,9±2,3×10 ⁸	4,6±2,6×10 ⁵
<i>B. boum</i> Д3	8,1±1,3×10 ⁹	2,1±3,5×10 ⁸	3,4±1,2×10 ⁸	6,8±4,2×10 ⁵
<i>B. boum</i> Д4	7,0±2,1×10 ⁹	4,9±1,0×10 ⁸	-	-
<i>B. boum</i> 6	1,5±0,2×10 ¹⁰	6,4±3,2×10 ⁸	5,6±3,2×10 ⁸	2,9±1,2×10 ⁶
<i>B. thermophilum</i> 4	1,2±0,3×10 ¹⁰	7,5±4,1×10 ⁹	-	-
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ				
<i>B. longum</i>	8,1±2,3×10 ⁹	5,2±2,9×10 ⁶	7,3±2,0×10 ⁸	4,4±2,1×10 ⁶
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	9,2±3,1×10 ¹⁰	3,3±1,6×10 ⁸	7,7±3,1×10 ⁹	6,8±2,2×10 ⁸
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	1,2±0,2×10 ¹⁰	4,8±2,0×10 ⁸	8,5±3,2×10 ⁹	8,8±5,9×10 ⁸
<i>B. angulatum</i>	9,8±3,5×10 ¹⁰	4,6±2,2×10 ⁷	-	-
<i>B. bifidum</i>	2,9±1,7×10 ¹⁰	8,7±4,3×10 ⁸	5,4±2,0×10 ⁹	4,0±2,1×10 ⁷

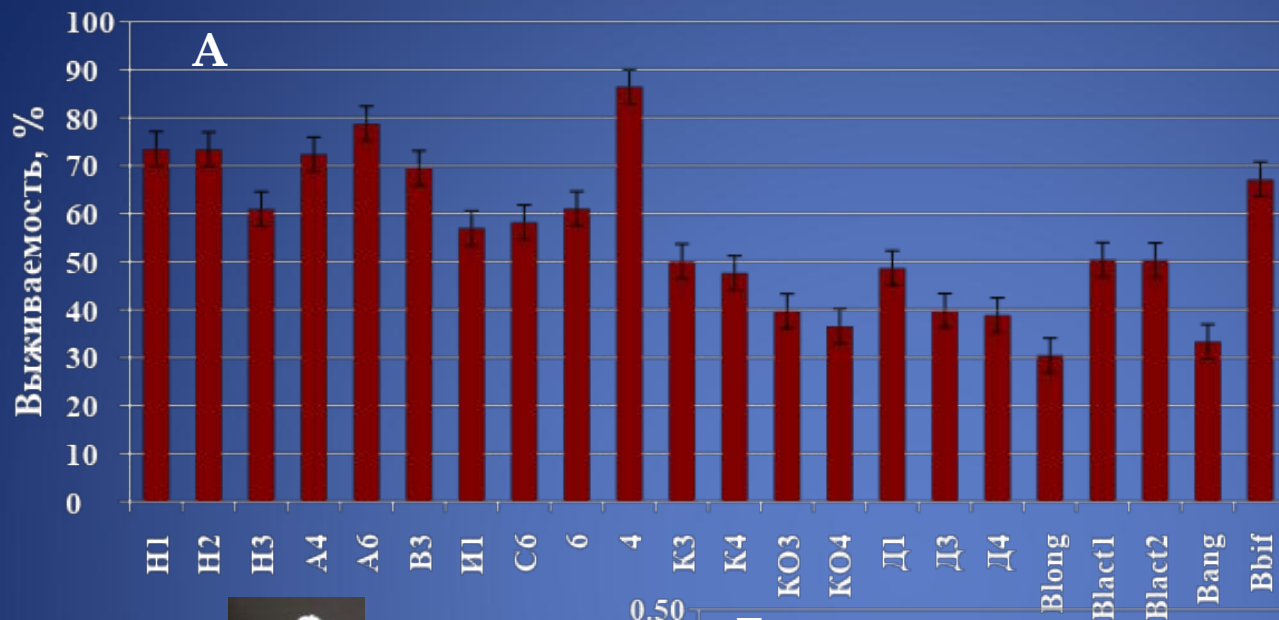
Рисунок 7 – Выживаемость выделенных и референтных штаммов бифидобактерий в модельных условиях пищеварительного тракта



рН 2,0,
пепсин,
3 ч

рН 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

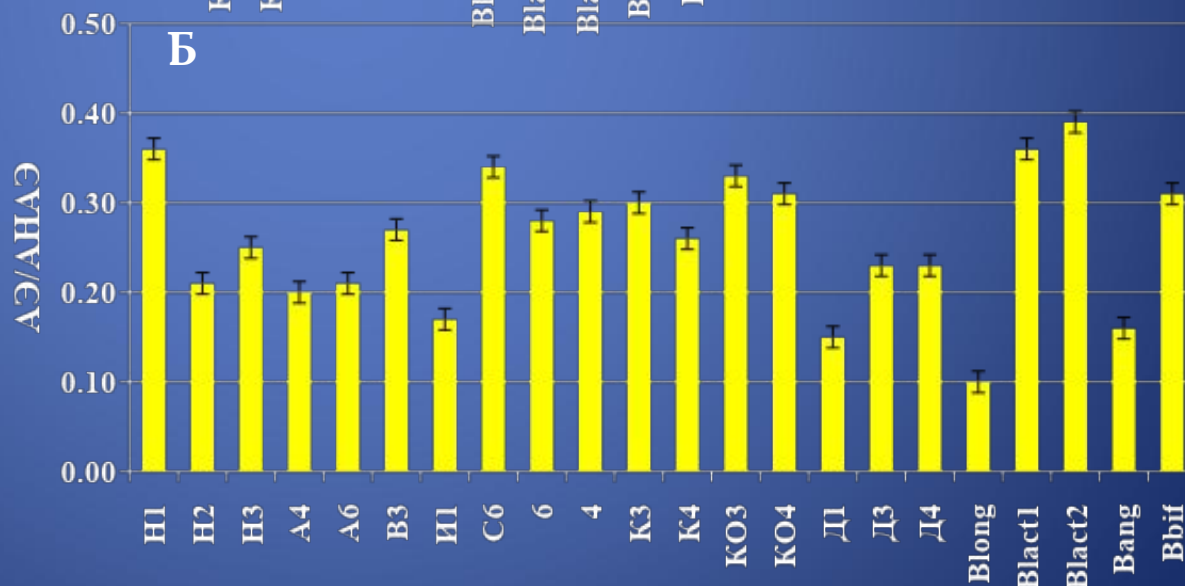
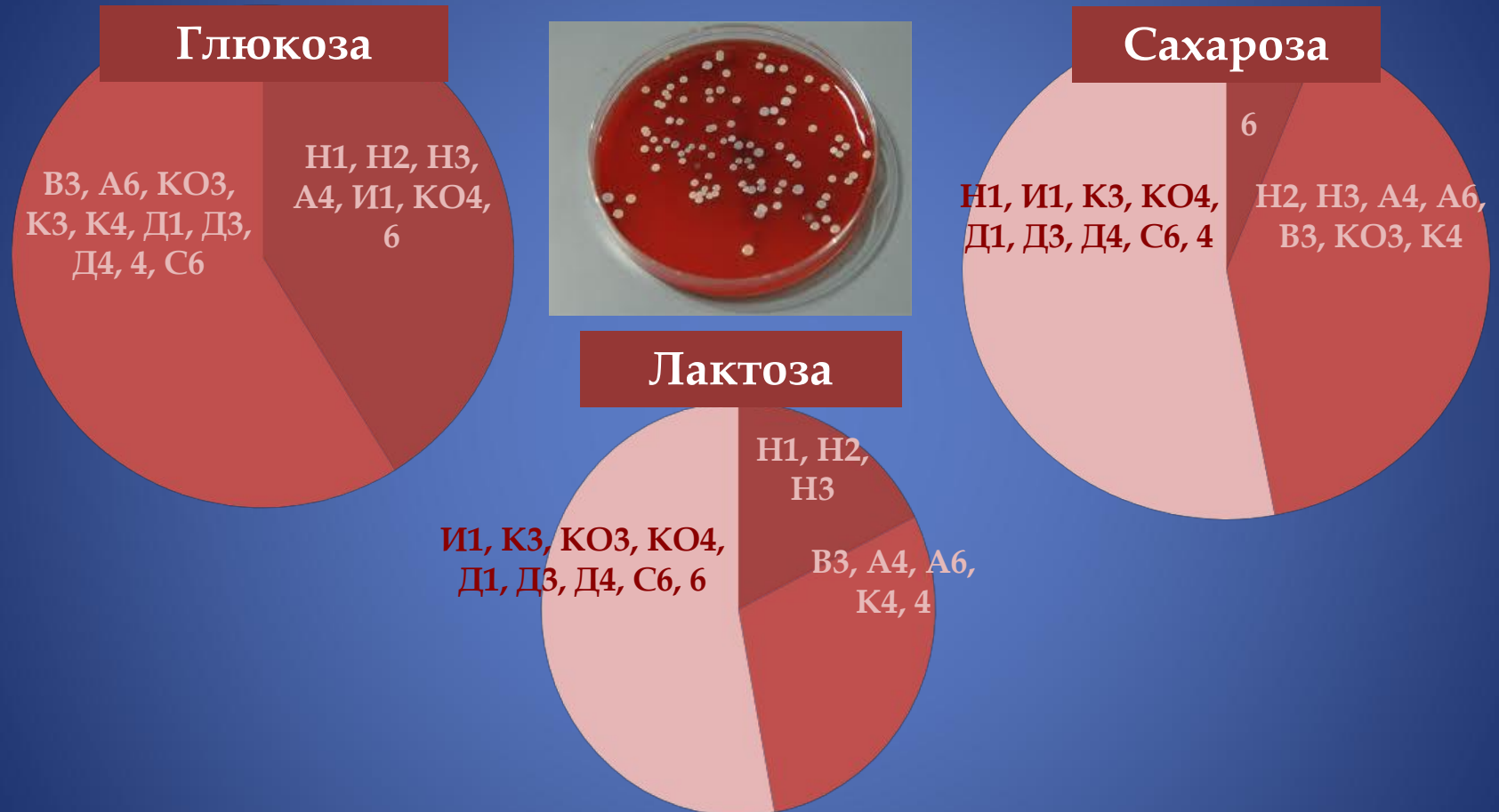


Рисунок 9 – Способность выделенных штаммов бифидобактерий образовывать экзополисахариды



интенсивно образуют ЭПС

образуют ЭПС

не образуют ЭПС

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

Штамм	Тест-культура											
	<i>E. coli</i>					<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>P. vulgaris</i>	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>	<i>Enterobacter sp.</i>
	БИДМ В-238	БИДМ В-378	БИДМ В-379	К-3	КМДЭ В-39А	БИДМ В-153	БИДМ В-155	БИДМ В-752	БИДМ В-108	БИДМ В-169	КМДЭ В-1071	БИДМ 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	-
Blacl1	-	-	-	-	4,0±0,1	8,0±0,2	8,3±0,3	-	-	-	-	-
Blacl2	-	-	-	-	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									
<i>B. adolescentis</i> H1	1,0	60,0	1,0	0,2	1,0	100,0	4,0	10,0	0,1
<i>B. longum</i> H3	0,5	20,0	2,0	0,1	0,2	80,0	1,0	8,0	0,05
<i>B. longum</i> B3	1,0	20,0	2,0	0,5	5,0	100,0	2,5	2,5	0,2
<i>B. longum</i> A4	0,5	30,0	0,8	0,4	0,5	100,0	2,0	10,0	0,5
<i>B. animalis ssp. lactis</i> H2	0,5	50,0	3,0	0,1	0,5	100,0	2,0	10,0	0,05
<i>B. animalis ssp. lactis</i> A6	4,0	30,0	2,0	1,0	4,0	200,0	4,0	6,0	0,1
<i>B. animalis ssp. lactis</i> И1	1,0	50,0	1,0	0,1	0,5	100,0	4,0	10,0	0,05
<i>B. pseudolongum</i> C6	2,0	80,0	0,8	0,1	1,0	100,0	2,5	4,0	0,2
<i>B. pseudolongum</i> K4	2,0	100,0	0,8	0,5	1,0	150,0	4,0	5,0	0,05
<i>B. animalis ssp. animalis</i> K3	1,0	120,0	1,0	0,2	2,0	100,0	3,0	5,0	0,1
<i>B. animalis ssp. animalis</i> KO3	1,5	100,0	2,0	0,2	2,0	80,0	1,5	6,0	0,1
<i>B. animalis ssp. animalis</i> KO4	1,0	50,0	2,0	0,5	2,0	80,0	1,5	8,0	0,2
<i>B. animalis ssp. animalis</i> Д1	3,0	60,0	1,0	0,1	4,0	250,0	1,0	10,0	0,5
<i>B. boum</i> Д3	1,0	40,0	1,0	1,0	1,0	80,0	4,0	8,0	0,2
<i>B. boum</i> Д4	1,0	40,0	1,0	0,5	0,5	100,0	3,0	8,0	0,05
<i>B. boum</i> 6	0,5	60,0	1,0	0,7	1,0	80,0	4,0	5,0	0,2
<i>B. thermophilum</i> 4	0,5	60,0	0,8	1,0	5,0	100,0	2,0	6,0	0,5
РЕФЕРЕНТНЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ									
<i>B. longum</i>	0,5	30,0	1,0	0,1	1,0	100,0	2,0	5,0	0,1
<i>B. animalis ssp. lactis</i> 1	0,5	100,0	1,0	0,1	5,0	100,0	4,0	10,0	0,3
<i>B. animalis ssp. lactis</i> 2	0,5	150,0	1,0	0,7	5,0	150,0	4,0	10,0	0,5
<i>B. angulatum</i>	0,5	200,0	0,8	0,1	10,0	80,0	2,0	8,0	0,1
<i>B. bifidum</i>	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 (рН 2,0, 180 мин)



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

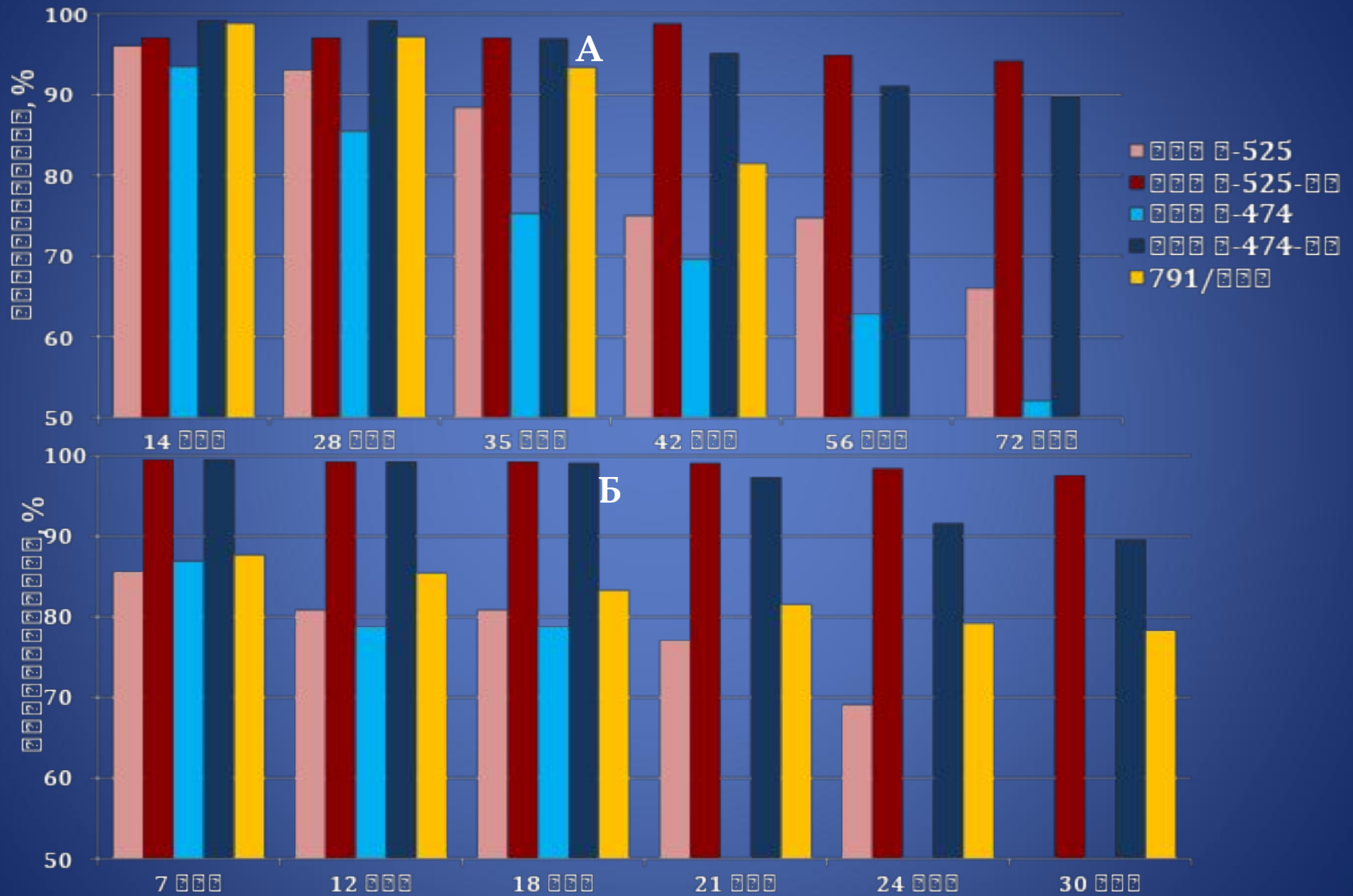
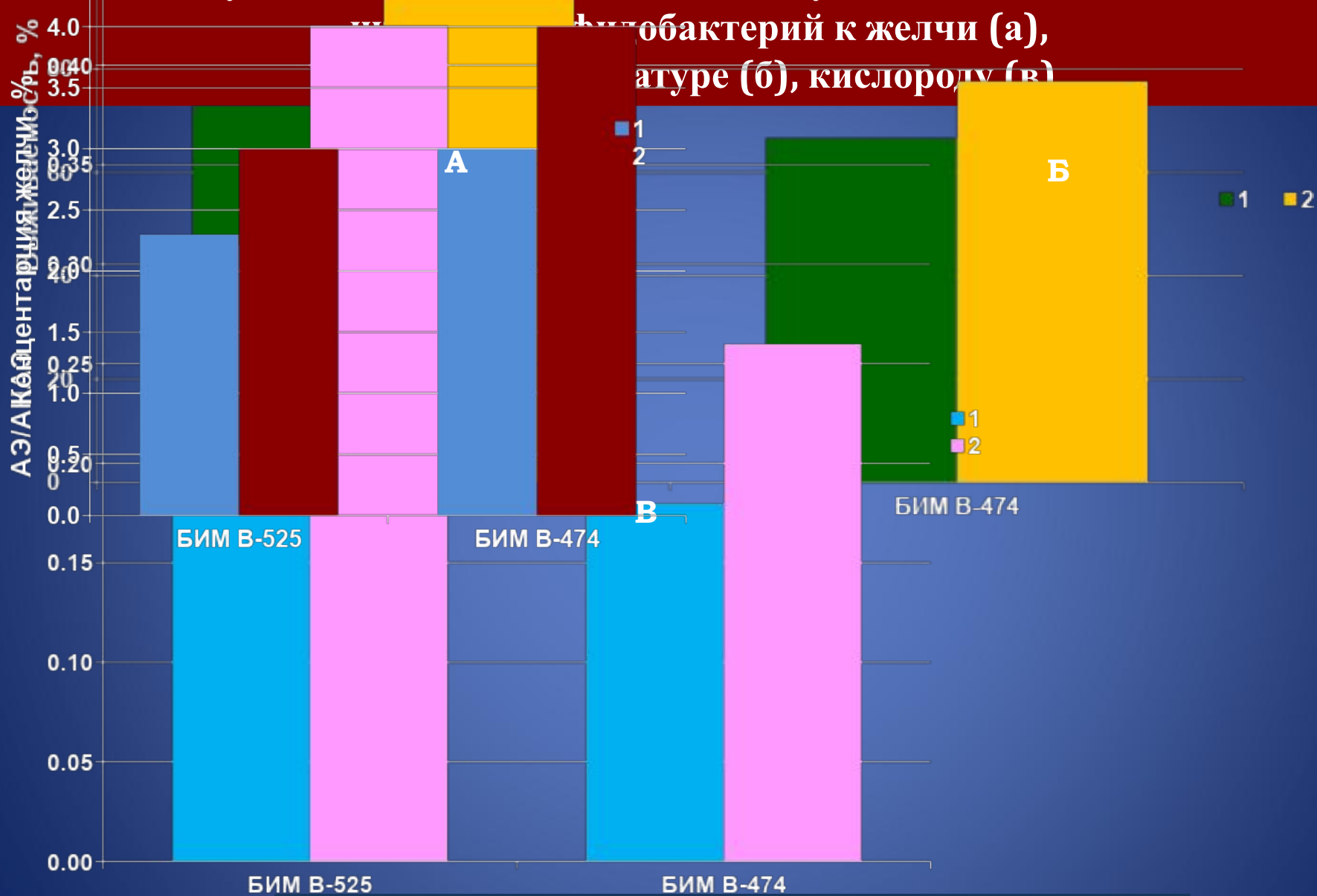


Рисунок 12 – Устойчивость кислотоустойчивых и исходных бифидобактерий к желчи (а), температуре (б), кислороду (в)



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 рН 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* ВIF12г, а по жизнеспособности при хранении (4 °С) превосходят лучший аналог *B. bifidum* 791/БАГ (на 11–19 %)

Рисунок 13 – Выживаемость бифидобактерий после криоконсервации

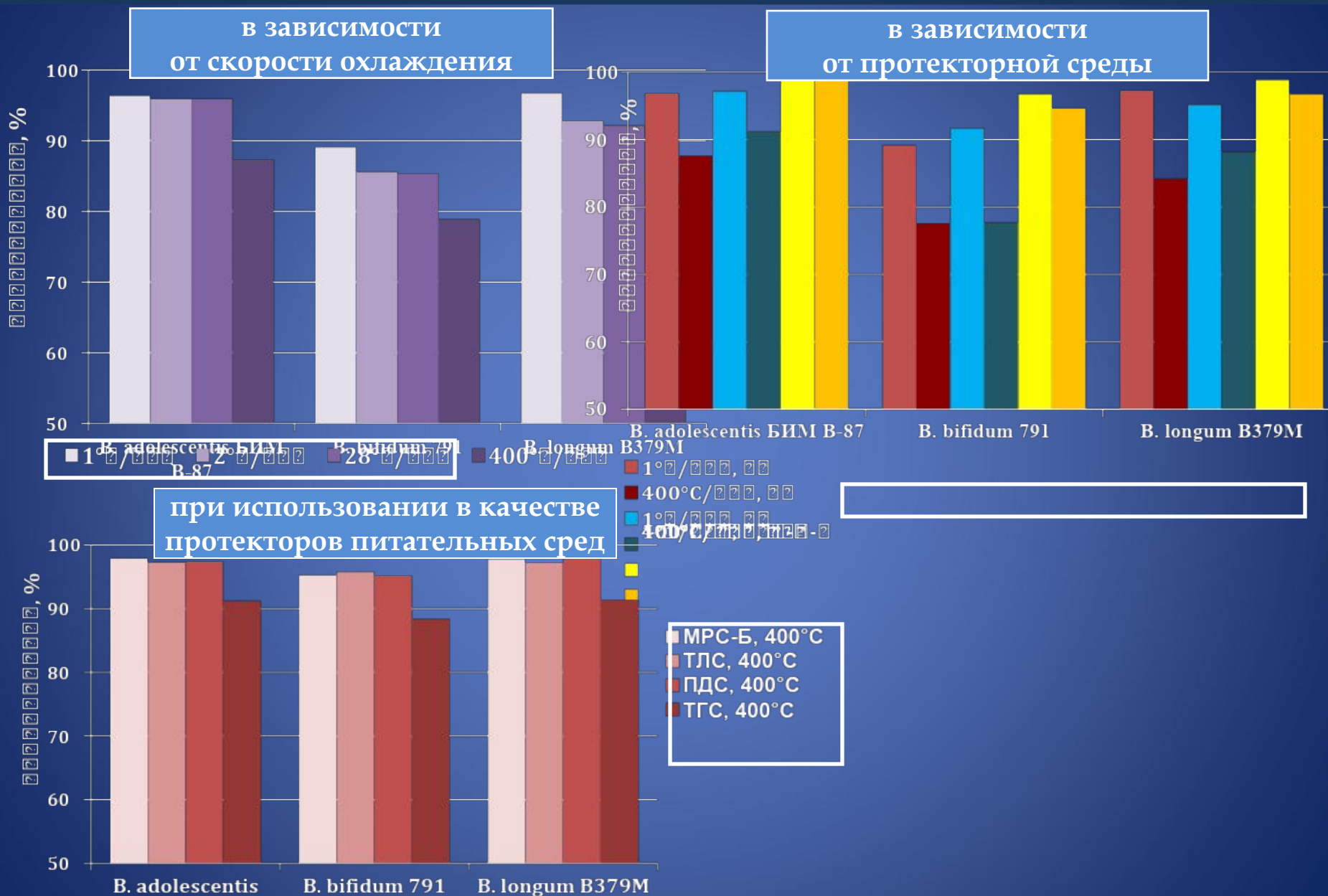
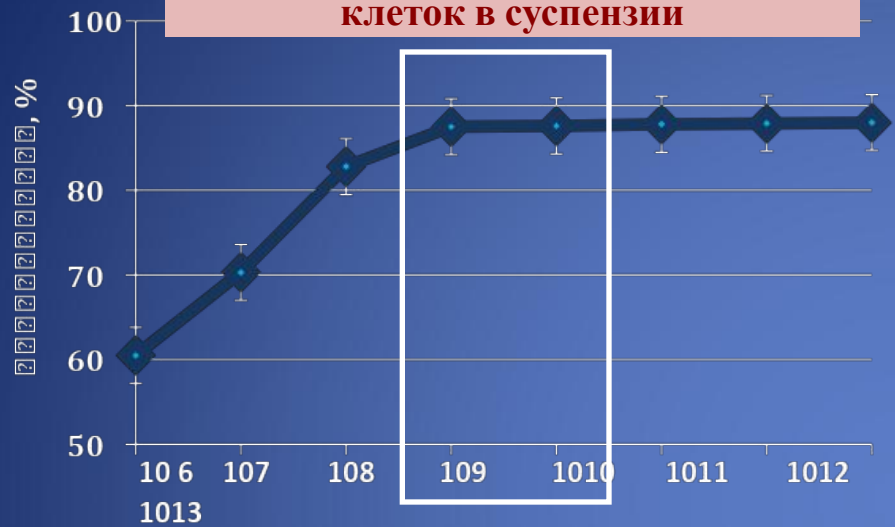


Рисунок 14 - Выживаемость бифидобактерий после криоконсервации

в зависимости от концентрации клеток в суспензии



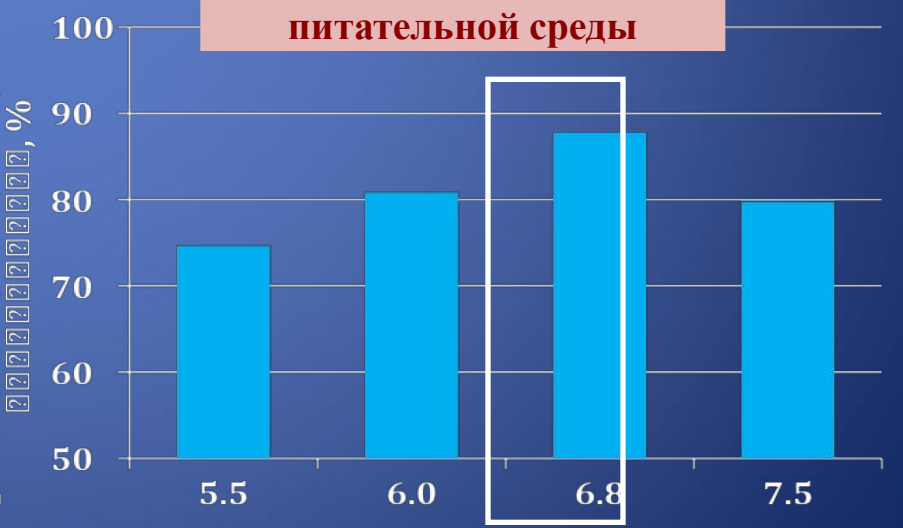
в зависимости от возраста культуры



в зависимости от состава питательной среды



в зависимости от pH питательной среды



Оптимизация условий криоконсервации бифидобактерий

СПОСОБ КРИОКОНСЕРВАЦИИ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Культивирование бифидобактерий

Выращивание бактерий в жидкой питательной среде, содержащей твин-80, рН 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)



Рисунок 15 – Выживаемость бифидобактерий в течение при хранении методом криоконсервации

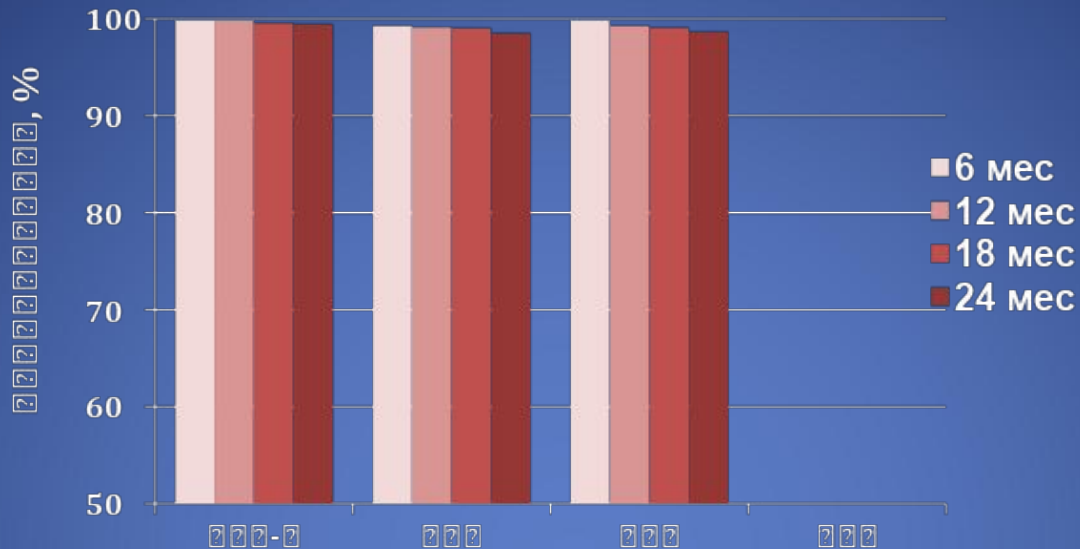


Рисунок 16 – Морфология клеток *B. adolescentis* БИМ В-87 после 2-х лет хранения методом криоконсервации

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

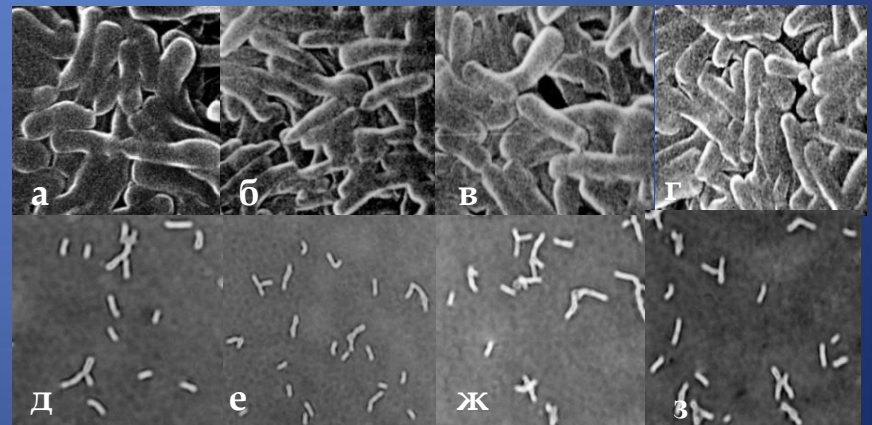


Рисунок 17 – Динамика развития *B. adolescentis* БИМ В-87 при глубинном культивировании в питательной среде МРС-Б после 2-х лет хранения методом криоконсервации

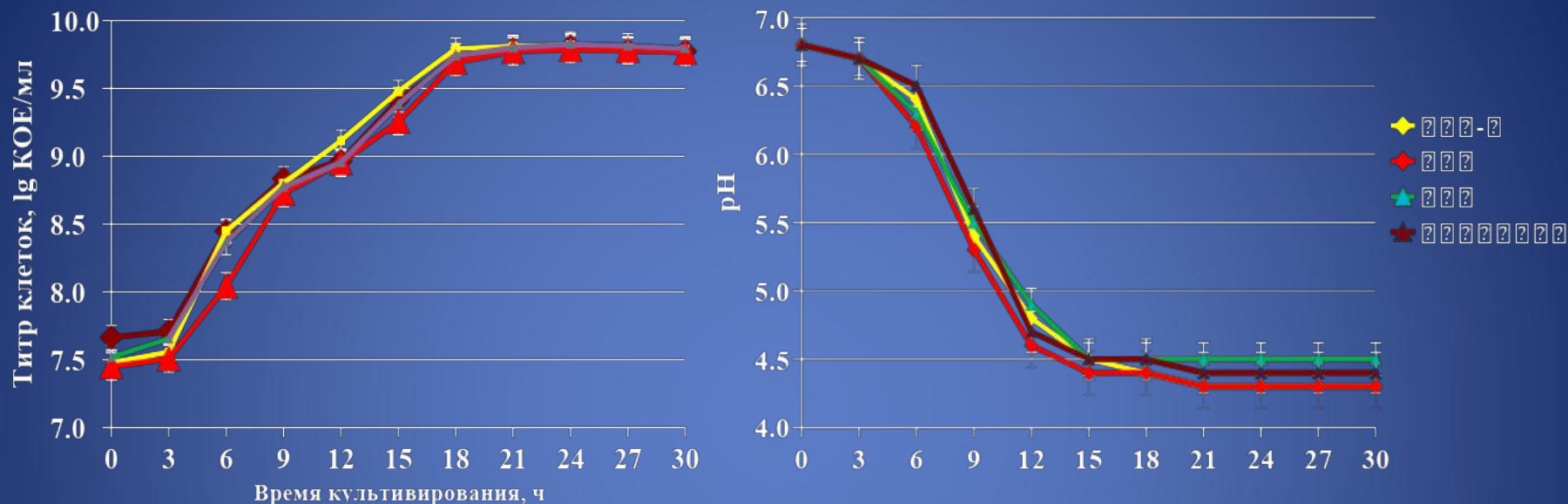
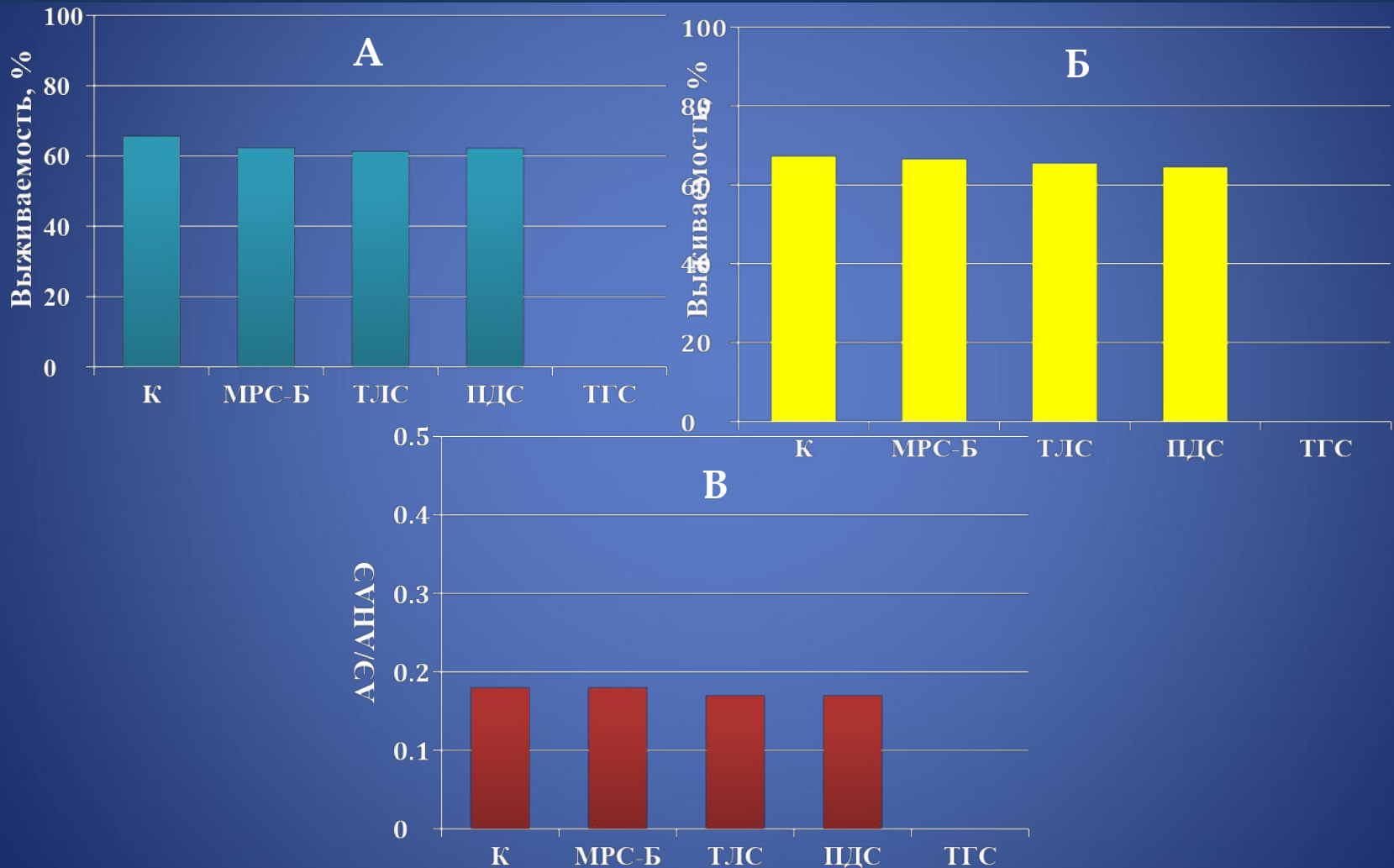
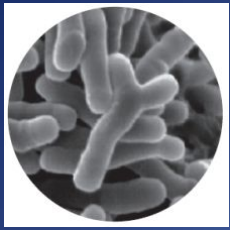


Таблица 11 – Рост *B. adolescentis* БИМ В-87 в коровьем молоке после 2-х лет хранения методом криоконсервации

Протекторная среда	Время сквашивания, ч	рН	Титр клеток, КОЕ/мл
Контроль	12	4,2±0,2	5,8±1,2×10 ⁹
МРС-Б	12	4,3±0,2	5,6±2,1×10 ⁹
ТЛС	12	4,2±0,2	5,1±2,3×10 ⁹
ПДС	12	4,3±0,2	5,3±2,2×10 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 *V. adolescentis* БИМ В-462 Д и *V. 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
<i>V. bifidum</i> БИМ В-465 Д	$6,6 \pm 2,1 \times 10^{10}$	$6,2 \pm 1,8 \times 10^{10}$	$5,9 \pm 1,6 \times 10^{10}$
<i>V. bifidum</i> БИМ В-525	$3,2 \pm 1,6 \times 10^{10}$	$2,8 \pm 1,4 \times 10^9$	$4,1 \pm 1,2 \times 10^7$
<i>V. adolescentis</i> БИМ В-462 Д	$8,9 \pm 1,5 \times 10^9$	$8,3 \pm 1,9 \times 10^9$	$7,8 \pm 1,7 \times 10^9$
<i>V. adolescentis</i> БИМ В-474	$2,6 \pm 1,8 \times 10^9$	$9,5 \pm 3,8 \times 10^7$	$7,3 \pm 2,5 \times 10^5$

**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			
	<i>B. longum</i> БИМ В-647	<i>B. longum</i> БИМ В-648	<i>B. animalis ssp. lactis</i> БИМ В-645	<i>B. animalis ssp. lactis</i> 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, рН	4,3±0,1	4,2±0,1	4,5±0,1	4,5±0,1
Титр клеток, КОЕ/мл	3,2±2,1×10 ¹⁰	2,4±1,3×10 ¹⁰	2,6±1,8×10 ⁹	4,3±2,0×10 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, рН	4,3±0,1	4,2±0,1	4,5±0,1	4,4±0,1
Титр клеток, КОЕ/мл	8,4±2,2×10 ⁷	5,6±2,1×10 ⁷	7,3±2,8×10 ⁸	6,9±2,5×10 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
<i>B. adolescentis</i> БИМ В-642	$3,8 \pm 0,8 \times 10^7$	$7,3 \pm 0,3 \times 10^8$	$7,2 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> БИМ В-643	$3,7 \pm 1,1 \times 10^7$	$8,4 \pm 1,6 \times 10^7$	$7,2 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,1$
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> БИМ В-644	$3,3 \pm 0,2 \times 10^7$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^7$	$7,2 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> БИМ В-645	$1,6 \pm 0,5 \times 10^7$	$2,6 \pm 0,8 \times 10^7$	$7,2 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,1$
<i>B. longum</i> БИМ В-646	$3,2 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,4 \pm 0,3 \times 10^8$	$7,2 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
<i>B. longum</i> БИМ В-647	$2,4 \pm 0,6 \times 10^7$	$2,0 \pm 0,2 \times 10^8$	$7,2 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$
<i>B. longum</i> БИМ В-648	$1,2 \pm 0,3 \times 10^7$	$4,4 \pm 0,4 \times 10^8$	$7,2 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$

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



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

Штамм бифидобактерий	Титр клеток, КОЕ/мл		Кислотность, рН	
	0 ч	18 ч	0 ч	18 ч
<i>B. adolescentis</i> БИМ В-642	$3,8 \pm 1,4 \times 10^6$	$9,3 \pm 1,5 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,2$
<i>B. animalis ssp. lactis</i> БИМ В-643	$3,2 \pm 1,0 \times 10^6$	$9,4 \pm 2,6 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$
<i>B. animalis ssp. lactis</i> БИМ В-644	$3,2 \pm 0,8 \times 10^6$	$9,5 \pm 1,4 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
<i>B. animalis ssp. lactis</i> БИМ В-645	$2,6 \pm 0,9 \times 10^6$	$8,6 \pm 1,8 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,2$
<i>B. longum</i> БИМ В-646	$3,4 \pm 1,1 \times 10^6$	$9,6 \pm 1,3 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$
<i>B. longum</i> БИМ В-647	$2,9 \pm 1,0 \times 10^6$	$9,8 \pm 1,2 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
<i>B. longum</i> БИМ В-648	$2,2 \pm 1,1 \times 10^6$	$9,4 \pm 2,0 \times 10^9$	$5,7 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$

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			
<i>B. adolescentis</i> БИМ В-642	$9,3 \pm 1,5 \times 10^9$	$9,9 \pm 1,5 \times 10^8$	$3,2 \pm 1,0 \times 10^8$	$8,9 \pm 2,5 \times 10^7$
<i>B. animalis ssp. lactis</i> БИМ В-643	$9,4 \pm 2,6 \times 10^9$	$9,2 \pm 1,9 \times 10^8$	$3,6 \pm 1,5 \times 10^8$	$7,3 \pm 3,1 \times 10^7$
<i>B. animalis ssp. lactis</i> БИМ В-644	$9,5 \pm 1,4 \times 10^9$	$9,9 \pm 1,8 \times 10^8$	$4,3 \pm 1,8 \times 10^8$	$8,8 \pm 2,6 \times 10^7$
<i>B. animalis ssp. lactis</i> БИМ В-645	$8,6 \pm 1,8 \times 10^9$	$8,1 \pm 2,0 \times 10^8$	$3,9 \pm 1,2 \times 10^8$	$7,3 \pm 2,9 \times 10^7$
<i>B. longum</i> БИМ В-646	$9,6 \pm 1,3 \times 10^9$	$8,8 \pm 2,1 \times 10^8$	$3,3 \pm 1,6 \times 10^8$	$7,9 \pm 2,8 \times 10^7$
<i>B. longum</i> БИМ В-647	$9,8 \pm 1,2 \times 10^9$	$9,0 \pm 1,9 \times 10^8$	$3,4 \pm 1,3 \times 10^8$	$7,3 \pm 2,9 \times 10^7$
<i>B. longum</i> БИМ В-648	$9,4 \pm 2,0 \times 10^9$	$8,6 \pm 2,2 \times 10^8$	$2,9 \pm 1,7 \times 10^8$	$7,0 \pm 2,2 \times 10^7$

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

МЕХАНИЗМЫ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Продукция органических кислот

Продукция низкомолекулярных соединений

Продукция бактериоцинов и бактериоцин-подобных веществ

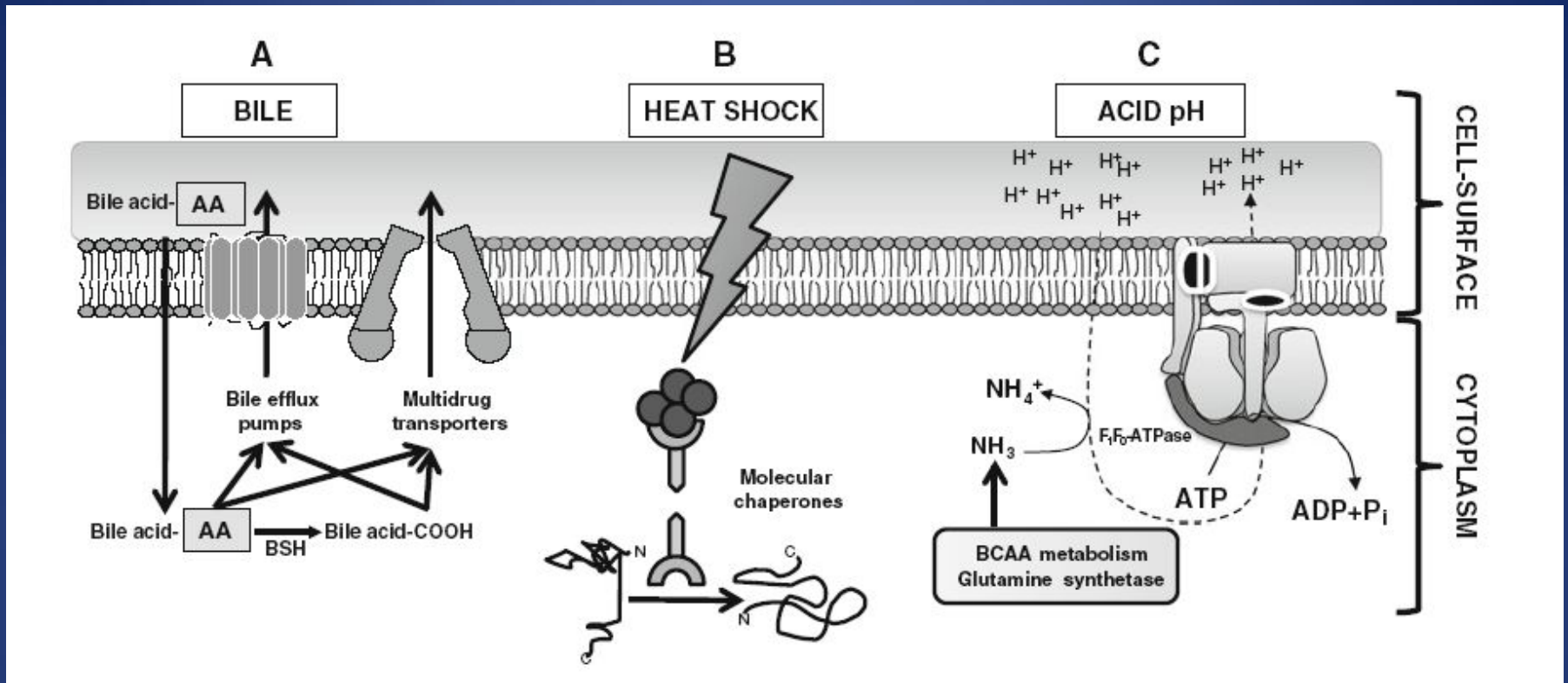
Конкуренция за пищевые субстраты и сайты адгезии на слизистой кишечника

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 цитоплазматической мембраны, снижение её проницаемости для желчи. Синтез молекулярных шаперонов и протеаз.



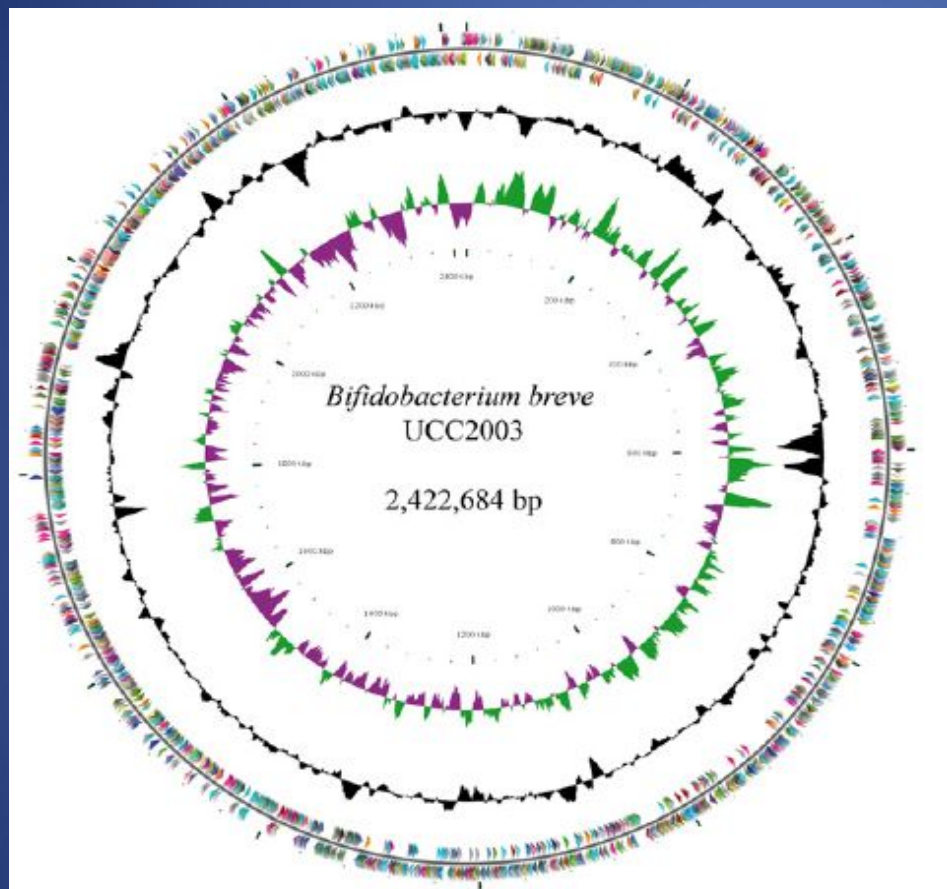
Ruiz L et al., Genes Nutr. 2011.

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
<i>B. adolescentis</i> ATCC15703	2 089 645	60	1631	54	5	5	Human GIT	NC_008618	C
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> AD011	1 933 695	60.5	1528	52	2	1	Infant faeces	NC_011835	C
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bl-04	1 938 709	60	1631	52	4	6	Infant faeces	NC_012814	C
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM10140	1 938 483	60	1629	51	4	6	Infant faeces	NC_012815	C
<i>B. dentium</i> Bd1	2 636 368	59	2278	55	4	7	Dental caries	NC_013714	C
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC15697	2 832 748	60	2498	79	4	26	Infant faeces	NC_011593	C
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> DJO10A	2 375 792	60	1990	58	4	44	Human GIT	NC_010816	C
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> NCC2705	2 256 640	60	1727	57	4	46	Human GIT	NC_004307	C
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> JDM301	2 477 838	60	2035	55	3	ND	Human GIT	CP002010	C
<i>B. gallicum</i> DSM20093	2 019 802	57	1980	ND	ND	ND	Human GIT	ABXB000000000	UC
<i>B. pseudocatenulatum</i> DSM20438	2 304 808	56	2151	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABXX000000000	UC
<i>B. catenulatum</i> DSM16992	2 058 429	56	2011	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABXY000000000	UC
<i>B. bifidum</i> NCIM41171	2 186 140	62	1811	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABQP000000000	UC
<i>B. angulatum</i> DSM20098	2 007 108	59	1811	ND	ND	ND	Human GIT	NZ_ABYS000000000	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