

ЖИЛЕНКОВА ОЛЬГА ГЕННАДЬЕВНА

**СЕЛЕКЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННО ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ
БИФИДОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ**

03.02.03 – микробиология

03.01.06 — биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в Федеральном Государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

доктор биологических наук Амерханова Аделаида Михайловна

кандидат биологических наук,

доцент

Воронина Ольга Львовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,

профессор

Мазурова Изабелла Константиновна

доктор медицинских наук,

профессор

Анкирская Алла Семеновна

Ведущая организация:

ГОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования
Минздравсоцразвития РФ

Защита состоится «_10_» _февраля_ 2011 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 в Федеральном Государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «_29_» _декабря_ 2010г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук

О.Ю.Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Бифидобактерии являются важнейшими симбионтами желудочно-кишечного тракта человека. У детей к 3-х месячному возрасту их доля в микробиоме составляет 99 %, что свидетельствует о ведущей роли этой группы бактерий в становлении и развитии систем гомеостаза детского организма. Они обладают морфокинетическим действием, образуют ферменты, участвующие в метаболизме белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот, продуцируют биологически активные соединения, в частности, витамины группы В, выполняют иммуногенную и антимуtagenную функции, а также участвуют в детоксикации экзо- и эндогенных токсических агентов (Mitsuoka T. et.al.,1974; Гончарова Г.И., 1986; Новик Г.И., 1998; Шендеров Б.А., 1998, 2008, 2010; Gore S., 2008; Smehilova' M. et.al., 2008; Sanders M.E.;Marco M.L., 2010).

В современных условиях массированного антропогенного воздействия на биосферу страдает не только природа, но и сам человек, в частности, негативные изменения в онтогенезе происходят и на уровне его микроэкологии, нарушая ход её развития.

С 80-х годов прошлого века и по настоящее время исследователи отмечают дефицит бифидофлоры и снижение ее видового разнообразия у детей раннего возраста, признанных клинически здоровыми. Изменение видового состава бифидофлоры также стало характерным явлением последних двух десятилетий (Venno Y. et al., 1984; Гончарова Г.И., 1986; Vilková E et al., 2004; Young S.L., et al., 2004; Шкоропов А.Н. и др. , 2007).

Период первичного становления микробиоценоза можно без преувеличения назвать базисом здоровья человека в будущем. Вместе с тем, целый ряд факторов может стать причиной возникновения дисбиотических нарушений, и их коррекция требует применения таких пробиотических средств, которые учитывали бы особенности бифидофлоры современных детей. Так, рациональный подход к конструированию и применению новых средств коррекции микрофлоры должен учитывать такое явление, как аутогенная сукцессия - последовательность смены биоценозов в определенной экологической нише (Сукачев В.Н., 1964; Бигон М., Харпер Дж, 1989; Рыбальченко О.В., 2008). В ходе этого процесса в видовом сообществе происходит последовательное вытеснение одних видов другими вследствие их биоэкологических преимуществ в определенных условиях. В микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человеческого организма, данная закономерность прослеживается в смене видового состава бифидофлоры в процессе онтогенеза.

Важно отметить при этом, что вмешательство неблагоприятных факторов, таких как отсутствие грудного вскармливания, эндогенные инфекции, неблагоприятная экология и пр. могут нарушить естественный ход развития микробиоценоза ребенка (Соколова К.Я., 1999; Мухина Ю.Г., 2005; Кафарская Л.И., 2006; Smehilova´ M. et.al., 2008).

В связи с изменениями в микроэкологии ЖКТ ребенка первостепенное значение приобретает необходимость всестороннего изучения видового спектра и фенотипических особенностей бифидобактерий, которые являются физиологичными для детей, и селекции штаммов, наиболее перспективных для производства пробиотических перепаратов.

Изучение выделенных культур должно основываться на комплексной методологии, включающей изучение их антибиотикорезистентности, культуральных, антагонистических, морфологических, физиолого-биохимических свойств и молекулярно-генетической идентификации с последующей селекцией штаммов, наиболее перспективных для конструирования пробиотических препаратов для детей. Это позволит проводить коррекцию микроэкологических нарушений более эффективно и безопасно.

Цель исследования - селекция производственно-перспективных штаммов бифидобактерий, как резерва для конструирования пробиотических препаратов для детей.

Задачи исследования

1. Разработать метод выделения бифидобактерий из содержимого ЖКТ (фекалий) детей 1-18 месяцев и 3-5 лет.
2. Произвести выделение культур бифидобактерий, изучить их морфологические и культуральные свойства.
3. Провести сравнительное изучение рекомендованных нормативными документами коммерческих биохимических микротест-систем применительно к изучению сахаролитических свойств бифидобактерий и возможности их видовой идентификации.
4. С помощью молекулярно-генетического типирования определить видовую принадлежность выделенных бифидобактерий и оценить видовое разнообразие бифидофлоры исследуемых групп детей.
5. Адаптировать методы определения антибиотикорезистентности, применяемые для патогенных микроорганизмов, к бифидобактериям, и изучить отношение выделенных культур к антибактериальным веществам.
6. По совокупности фено- и генотипических признаков провести отбор наиболее перспективных штаммов, как основы для пробиотических препаратов.

7. Сконструировать консорциумы из референсных производственных вновь выделенных штаммов бифидобактерий, проанализировать их пробиотические и технологические свойства.

Научная новизна

Разработана новая технология селекции бифидобактерий с целью совершенствования пробиотических препаратов для детей младшего возраста, которая основана на выделении бифидобактерий, всестороннем изучении их фенотипических свойств и видовой идентификации с помощью молекулярно-генетического анализа на основе секвенирования фрагментов генов 16S *rDNA* и трансальдолазы (*tal*). Данная технология дает возможность проводить комплексный скрининговый анализ пула выделенных культур с целью селекции штаммов по заданным критериям, применима к практике работы с коллекционными штаммами и для использования в производстве пробиотических препаратов.

Получены новые данные о видовом разнообразии бифидофлоры здоровых детей, относящихся к двум возрастным группам: 1-18 месяцев и 3-5 лет. Установлено более широкое видовое разнообразие бифидобактерий детей раннего возраста, по сравнению с бифидофлорой детей старшей возрастной группы. Биоразнообразие видов в младшей группе компенсирует незрелость ферментативной системы в данный возрастной период. В старшей группе детей выделение 3-х видов, отличающихся высокой биохимической активностью, коррелирует с большей зрелостью ЖКТ и сменой видов в процессе сукцессии в силу их экологического преимущества.

Отобрано семь штаммов бифидобактерий, перспективных для конструирования пробиотических препаратов для детей младшего возраста. На них получены патенты РФ.

Практическая значимость

Разработаны и апробированы на большом количестве штаммов новые методы определения антибиотикорезистентности бифидобактерий. Для практики изучения коллекционных культур отобраны 36 антимикробных веществ, относящихся к 17 группам антибиотиков. Впервые разработана панель из 15 антимикробных препаратов, значимых для штаммовой идентификации микроорганизмов рода *Bifidobacterium*, которые относятся к 8 группам: пенициллинам; цефалоспорином 1 и 3-его поколения; аминогликозидам 1, 2 и 3-ого поколения; тетрациклинам, фторхинолонам и макролидам.

Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры (ГКНМ) ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора пополнена 287 культурами бифидобактерий, представляющими материал для углубленного изучения биологических свойств бифидобактерий, выделенных

от современных детей. Из них 37 штаммов бифидобактерий паспортизированы и депонированы в коллекции. Для проведения скрининговых исследований биохимической активности культур бифидобактерий предложена коммерческая микротест-система ANAEROtest-23 (Pliva Lachema Diagnostica, Чешская Республика).

Последовательности фрагментов генов 37 штаммов бифидобактерий были аннотированы и зарегистрированы в GenBank.

На основе результатов, полученных при морфологическом изучении выделенных культур, референсных и типовых штаммов бифидобактерий, создана фототека колоний и микропрепаратов клеток, предназначенная для коллекционной работы.

Внедрение результатов работы в практику

Разработанные методические подходы для изучения фено- и генотипических свойств бифидобактерий вошли в МУК 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов». Новая технология селекции и изучения бифидобактерий используется в научной и практической работе лабораторий и ГКНМ ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и внедряется в работу других научно-практических и производственных лабораторий РФ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработана новая технология выделения и изучения фенотипических свойств бифидобактерий, их видовой идентификации, основанная на усовершенствованных и стандартизованных приемах проведения исследований, которая перспективна для селекции новых штаммов и ведения коллекционных и производственных культур бифидобактерий.

2. С использованием генотипирования на основе секвенирования фрагментов двух генов *16S rDNA* и *tal* изучен видовой состав бифидобактерий, выделенных от современных клинически здоровых детей двух возрастных групп: 1-18 месяцев и 3-5 лет.

3. На основе анализа данных, полученных при фенотипическом и молекулярно-генетическом изучении выделенных штаммов бифидобактерий, отобраны наиболее перспективные штаммы для использования при конструировании пробиотических препаратов для детей.

4. Устойчивые консорциумы, сочетающие референсные и вновь выделенные штаммы бифидобактерий, проявляют синергидный эффект.

Апробация работы

Диссертация апробирована на заседании секции «Медицинская биотехнология» Ученого совета ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, протокол № 2 от 19.10.2010.

Результаты диссертационной работы были представлены на Международном конгрессе «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты» (Санкт-Петербург, 2007); Международном междисциплинарном симпозиуме «От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине» (Судак, Украина, 2008); 2-м Международном конгрессе «Санкт-Петербург-Пробиотики-2009»; Международной научной конференции «Пробиотики и Пребиотики» (Кошице, Словакия, 2010).

Связь темы исследования с планом научной работы учреждения

Диссертационная работа проведена в рамках НИР (рег. № 01.2.006.08847) и темы «Паспортизация пробиотических штаммов для ЗПВ, оценка их безопасности и функциональной эффективности» в рамках Государственного контракта № 02.522.12.2009 от 26.06.2008.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 38 научных работ, в том числе, 6 - в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации; 7 - в сборниках научных трудов; 17 – в материалах конференций; 7 патентов на изобретение РФ; 1 – методические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 10 глав собственных исследований, заключения и выводов. Список литературы включает 201 источник, в том числе, 146 отечественных и 55 иностранных авторов. Диссертация содержит 39 таблиц и 20 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Характеристика обследованных детей. Для изучения индигенных бифидобактерий современных детей было сформировано 2 группы:

1) 25 детей 3-5 лет, относящихся, по заключению врачей, к I и II группам здоровья (далее по тексту – старшая группа детей);

2) 11 детей в возрасте от 1 до 18 месяцев, рожденных здоровыми матерями естественным путем, находившихся на грудном или смешанном вскармливании (далее по тексту - младшая группа детей).

Все дети на момент исследования признаны врачами клинически здоровыми. Не менее чем за неделю до исследования из их рациона исключали продукты, препараты и смеси, содержащие бифидобактерии.

Штаммы микроорганизмов. В качестве референсных использовали всесторонне изученные и используемые в производстве штаммы бифидобактерий из ГКНМ ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора: ГКНМ - 79 - *B. longum* В379М; ГКНМ - 80 - *B. bifidum* 791; ГКНМ - 150 - *B. breve* 79-88; ГКНМ - 155 - *B. infantis* 73-15; ГКНМ - 159 - *B. adolescentis* ГО-13.

Определение антагонистической активности проводили с **тест-культурами**, полученными из ГИСК им. Л.А. Тарасевича: *Shigella flexneri* 170, *Shigella flexneri* 337, *Shigella sonnei* 5063, *Escherichia coli* 157, *Staphylococcus aureus* 209, *Proteus vulgaris* 177, *Proteus mirabilis* 237.

Культуральные среды, условия роста и хранения культур микроорганизмов. В работе применяли как отечественные, так и импортные лабораторные и производственные питательные среды, рекомендованные нормативными документами и соответствующие нормам ВОЗ, имеющие сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000: МПА, Сабуро, Эндо, стафилококковый агар; БС; МРС-4 производства ГНЦ НИИ прикладной микробиологии (г. Оболенск) и MRS (bioMerieux); агаровая среда Мюллера-Хинтона обогащенная; среда «Бруцелла», стерильное обезжиренное молоко, ГМ-среда.

Субстанции антибиотиков: гентамицина, ципрофлоксацина, доксициклина, эритромицина, ампициллина, цефтриаксона, азитромицина, ванкомицина, кларитромицина, для изучения минимальной подавляющей концентрации, предоставлены ФГУН ГНЦА (г. Москва).

Диски с антибиотиками. В работе использовали диски с антибиотиками производства НИИЭМ им. Пастера (Россия) и HiMedia Laboratories Pvt. (Индия).

Методы исследований

В исследованиях использовали как традиционные методики, так и новые методические подходы, разработанные или модернизированные в ходе данной исследовательской работы. Штаммы бифидобактерий при выращивании в полужидких питательных средах, разлитых высоким столбиком, инкубировали в микроаэрофильных условиях. При выращивании на поверхности агаризованных сред – в анаэробных условиях в анаэростатах производства bioMerieux с использованием газогенерирующих пакетов GENbox anaero (bioMerieux, Франция), обеспечивающих концентрацию кислорода через 2,5 часа < 0,1 %, и через 24 часа - концентрацию углекислого газа > 15%. Температура

культивирования - $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Контроль создания анаэробноза осуществляли при помощи индикатора фирмы bioMerieux.

При изучении *морфологических свойств* определяли подвижность клеток, способность к образованию капсул и спор, тинкториальные свойства и характер расположения клеток в микроскопических препаратах.

Культуральные свойства изучали по характеру роста на полужидких и агаризованных питательных средах, способности накапливать биомассу на лабораторных и производственных средах: определяли количество КОЕ/мл, динамику накопления органических кислот, способность сквашивать обезжиренное молоко, наличие каталазной активности, разжижение желатины, устойчивость к соли и желчным кислотам.

Антагонистические свойства по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам изучали методом отсроченного антагонизма на агаризованных средах (Блинковой Л.П., 1986, 2002, 2004).

Изучение физиолого-биохимических свойств бифидобактерий

Применяли коммерческие тест-системы, рекомендованные Роспотребнадзором для идентификации анаэробов: API-50 и API-20A (bioMerieux, Франция), ANAEROtest 23 (PLIVA-Lachema Diagnostica s.r.o., Чешская Республика).

Генотипирование бифидобактерий проводили на основе секвенирования фрагментов генов *16S rDNA* и *tal* (Воронина О.Л., Карзанова М.Е., 2006). Консенсусные последовательности сравнивали с помощью пакета BLAST с данными GenBank. Видовую принадлежность устанавливали при сходстве 99-100%.

Изучение антибиотикорезистентности бифидобактерий

Предварительный этап определения минимальных подавляющих концентраций осуществляли стандартным методом двойных микроразведений. Для получения антибиотикограмм изучаемых штаммов использовали диско-диффузионный метод, модифицированный автором и адаптированный для исследования бифидобактерий.

Определение безвредности штаммов бифидобактерий проводили в соответствии с Государственной фармакопеей СССР, XI, выпуск 2. (1984 г.) на 200 белых беспородных половозрелых мышах обоего пола весом 23-26 г.

Статистическую обработку полученных данных проводили в рамках базовой программы статистики (Microsoft Excel) нахождения среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки (m). Число бактерий выражали в КОЕ/мл и \lg_{10} /мл или г исследуемого материала.

Лабораторные исследования проведены непосредственно автором настоящей работы в лабораториях ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского:

биологии бифидобактерий под руководством д.б.н. Амерхановой А.М., микробиологии и профилактики кишечных инфекций под руководством к.м.н. Пожалостиной Л.В., а также совместно с н.с. Киселевой И.А. в лаборатории клинической микробиологии, и сотрудниками отделения детских инфекций МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского под руководством д.м.н., профессора Феклисовой Л.В. и к.м.н Мескиной Е.Р.. Молекулярно-генетическая идентификация выделенных культур проведена в лаборатории молекулярной диагностики и генноинженерных конструкций ВНИИСБ РАСХН группой исследователей под руководством к.б.н. Лунина В.Г. и к.б.н. Ворониной О.Л.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение бифидобактерий из содержимого кишечника детей

Выделение бифидобактерий из фекалий обследуемых детей осуществляли по методике, разработанной автором, которая заключалась в многократном чередовании пересевов выросших после культивирования на селективной питательной среде изолированных колоний, характерных для бифидобактерий, с полужидкой на агаризованную БС, отбора и анализа отдельных колоний с целью получения однородных чистых культур бифидобактерий.

В результате проведенной работы выделено 287 культур. Изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств позволило отнести их к роду *Bifidobacterium*.

На основе материалов, полученных при морфологическом изучении вновь выделенных культур и референсных и типовых штаммов бифидобактерий, создана фототека колоний и микропрепаратов клеток, которая предназначена для работы с коллекционными культурами.

2. Изучение фенотипических свойств бифидобактерий

2.1. Исследования биохимических свойств бифидобактерий. Выбор среды культивирования определяли на основании критерия наибольшего соответствия сахаролитических способностей штамма описанию видов, выполненному Reuter G (1963 г.). При сравнении нескольких лабораторных сред, используемых для культивирования бифидобактерий, по этому критерию наиболее технологичной признана среда БС.

Изучение биохимических свойств проводили, используя параллельно три рекомендованные коммерческие биохимические тест-системы. Данные биохимического тестирования референсных штаммов бифидобактерий при помощи тест-систем представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты биохимического тестирования референсных штаммов бифидобактерий с помощью 3-х коммерческих тест-систем

Активный ингредиент	API-50CHL					API-20A					ANAERObtest -23				
	<i>B. bifidum</i> 791	<i>B. longum</i> B 379 M	<i>B. breve</i> 79-88	<i>B. infantis</i> 73-15	<i>B. adolescentis</i> ГО-13	<i>B. bifidum</i> 791	<i>B. longum</i> B 379 M	<i>B. breve</i> 79-88	<i>B. infantis</i> 73-15	<i>B. adolescentis</i> ГО-13	<i>B. bifidum</i> 791	<i>B. longum</i> B 379 M	<i>B. breve</i> 79-88	<i>B. infantis</i> 73-15	<i>B. adolescentis</i> ГО-13
L-рамноза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
дульцитол	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
эритрол	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-галактоза	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+
D-глюкоза	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-фруктоза	+	±	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+
D-лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-сахароза	0	±	±	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+
D-мальтоза	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+
D-мелибиоза	0	+	+	+	+	нет в тесте					нет в тесте				
D-раффиноза	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	±	+	+	+	+
L-арабиноза	0	+	0	0	+	±	±	0	±	±	±	+	0	±	±
D-ксилоза	0	+	0	±	0	±	0	±	±	±	±	0	±	±	±
салицин	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-целлобиоза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
D-манноза	0	0	±	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0
D-трегалоза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	+
D-меллицитоза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
инулин	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-манит	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0
D-сорбитол	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	0
инозит	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Отличия от данных Reuter G.					33	35					29				

Примечание: В левой графе таблицы серым цветом выделены субстраты, которые бифидобактерии не ферментируют; желтым – всегда утилизируемые бифидобактериями. В основной части таблицы желтым выделены ячейки с результатами соответствующими признаку у Reuter G, белые ячейки противоречат данным Reuter G. Количество противоречий для каждой системы по пяти штаммам сведено в последней графе.

Как видно из результатов, представленных в таблице, коммерческие биохимические тест-системы позволяют определить спектр сахаролитических свойств штаммов бифидобактерий.

Вместе с тем, результаты проведенных исследований показали, что с помощью изученных тест-систем невозможно идентифицировать до вида как референсные, так и вновь выделенные штаммы бифидобактерий, поскольку точность идентификации ограничивалась в большинстве случаев классом *Actinobacteria*. Наименьшее количество ошибок при этом отмечено при использовании тест-системы ANAEROtest -23 (PLIVALachema Diagnostica s.r.o., Чешская Республика), которая позволяет с 80% долей достоверности идентифицировать бифидобактерии только 2-х видов - *B. longum* и *B. breve* (Таблица 2).

Таблица 2

Идентификация референсных штаммов по данным коммерческих тест-систем

Штамм	API-50CHL	API-20A	ANAEROtest-23
ГКНМ 79-88 <i>B. breve</i>	<i>Actinomyces israelii</i> 62,4 %	<i>B. spp.2</i> 27%	<i>B. breve</i> 64,2%
ГКНМ В379М <i>B. longum</i>	<i>Actinomyces israelii</i> 99 %	<i>B. spp.2</i> 89,3 %	<i>B. longum</i> 99,8%
ГКНМ 791 <i>B. bifidum</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> 71,3 %	<i>B. spp. 1</i> 29,6%	<i>Eggerthella lentum</i> 100%
ГКНМ ГО -13 <i>B. adolescentis</i>	<i>Actinomyces israelii</i> 97,5 %	<i>B.spp.2</i> 97,5 %	<i>Eggerthella alactolyticum</i> 97%
ГКНМ 73-15 <i>B. infantis</i>	<i>Actinomyces israelii</i> 39,%	<i>B.spp.1</i> 71,3 %	<i>Eggerthella lentum</i> 92,6%
OV29-3ch	<i>Actinomyces odontolyticus</i> 100%	<i>B.spp.2</i> 93,5 %	<i>Actinomyces odontolyticus</i> 92%
OV1-1ch	<i>Actinomyces israelii</i> 98 %	<i>B. spp.2</i> 89 %	<i>B. longum</i> 99%

Следуя методическим указаниям МУК 2.3.2.2789-10, «штаммы с неясной этиологией не могут быть рекомендованы в качестве производственных», в связи с чем необходимо было остановиться на методе, позволяющем идентифицировать бифидобактерии до вида.

Анализ литературы и собственные исследования свидетельствуют, что для видовой идентификации бифидобактерий требуется применение молекулярно-генетических методов на основе секвенирования нескольких мишеней в геноме (Новикова Н.А., Соколова К.Я., 2004; Шкоропов Н.А., 2006; Бондаренко В.М., 2006; Gill S.R., 2006; Kazuyoshi N., 2008; Namba K., 2008 и др.).

3. Генотипирование штаммов бифидобактерий проводили на основе секвенирования фрагментов двух генов: *16S rDNA* и *tal*, что позволило установить вид каждого штамма.

Информационный ген *16S rDNA* позволяет достоверно разделить бифидобактерии только на уровне рода, но не позволяет различить генетически близкородственные виды бактерий. Поэтому проведено двухлокусное секвенирование с анализом последовательностей одного из операционных генов – *tal*, кодирующего наиболее значимые для бифидобактерий белки клеточного метаболизма (house-keeping genes), что позволяет не только различать близкородственные виды *B. infantis* и *B. longum*, *B. catenulatum* и *B. pseudocatenulatum*, но и выявлять внутривидовые различия для видов *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum*. Однако, данная мишень не позволяет дифференцировать виды *B. angulatum* и *B. catenulatum*, различимые по фрагменту *16S rDNA*.

Последовательности фрагментов генов были аннотированы и зарегистрированы в GenBank под номерами, указанными в таблицах 3,4 и 5.

Таблица 3

Видовая идентификация референсных штаммов бифидобактерий молекулярно-генетическими методами

Название штамма	Вид	GenBank Accession Number	
		<i>16S rDNA</i>	<i>tal</i>
ГКНМ: ГО-13	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i> EF409965	<i>B. adolescentis</i> EF417571
ГКНМ: 791	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> DQ887552	<i>B. bifidum</i> DQ887902
ГКНМ:79-88	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i> EF409969	<i>B. breve</i> EF417565
ГКНМ: 73-15	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum / infantis</i> DQ887556	<i>B. infantis</i> DQ887906
ГКНМ: В379М	<i>B. longum</i>	<i>B. longum / infantis</i> DQ887558	<i>B. longum</i> DQ887907

Таблица 4

Видовая идентификация штаммов, выделенных от детей 3-5 лет

№	Название штамма	Вид	GenBank Accession Number	
			<i>16S rDNA</i>	<i>tal</i>
1.	FHHMB OV2-1ch	<i>B. catenulatum</i>	HM989853	HM989860
2.	FHHMB OV1-1ch	<i>B. longum</i>	HM989851	HM989858
3.	FHHMB OV1-2ch	<i>B. longum</i>	HM989852	HM989859
4.	FHHMB OV7ch	<i>B. longum</i>	HM989854	HM989861
5.	FHHMB OV28-3ch	<i>B. longum</i>	HM989855	HM989862
6.	FHHMB OV29-3ch	<i>B. longum</i>	HM989850	HM989857
7.	FHHMB OV11-11ch	<i>B. animalis</i>	HM989849	HM989856

Таблица 5

Видовая принадлежность штаммов бифидобактерий, выделенных от грудных детей

№	Название штамма	Вид	GenBank Accession Number	
			<i>16S rDNA</i>	<i>tal</i>
1.	FHHMB: OV 2	<i>B. pseudocatenulatum</i>	EU272010	EU272016
2.	FHHMB: OV 5	<i>B. adolescentis</i>	FJ169926	FJ357018
3.	FHHMB: OV 7	<i>B. bifidum</i>	EU272011	EU272017
4.	FHHMB: OV 8	<i>B. bifidum</i>	FJ169930	FJ357019
5.	FHHMB: OV9	<i>B. pseudocatenulatum</i>	FJ169931	FJ357020
6.	FHHMB: OV 15	<i>B. angulatum</i>	EU272012	EU272020
7.	FHHMB: OV 17	<i>B. pseudocatenulatum</i>	EU334365	EU334366
8.	FHHMB: OV 18	<i>B. bifidum</i>	FJ169939	FJ357026
9.	FHHMB: OV 19	<i>B. bifidum</i>	EU272013	EU272019
10.	FHHMB: OV 20	<i>B. longum</i>	EU272014	EU272018
11.	FHHMB: OV 21	<i>B. pseudocatenulatum</i>	FJ169940	FJ357027
12.	FHHMB: OV 22	<i>B. adolescentis</i>	FJ169941	FJ357028
13.	FHHMB: OV 23	<i>B. bifidum</i>	FJ169942	FJ357029
14.	FHHMB: OV 24	<i>B. adolescentis</i>	FJ169943	FJ357030
15.	FHHMB: OV 1	<i>B. longum / pseudocatenulatum</i>	FJ357032	FJ357015
16.	FHHMB: OV 3	<i>B. pseudocatenulatum</i>	FJ169922	FJ357016
17.	FHHMB: OV 4-1	<i>B. ruminantium</i>	FJ169923	GQ848098
18.	FHHMB: OV 4-2	<i>B. breve</i>	FJ169924	FJ357017
19.	FHHMB: OV 4-3	<i>B. ruminantium</i>	FJ169925	GQ438825
20.	FHHMB: OV 6-1	<i>B. ruminantium</i>	FJ169927	GQ438826
21.	FHHMB: OV 6-3	<i>B. ruminantium</i>	FJ169928	GQ438827
22.	FHHMB: OV 6-3k	<i>B. ruminantium</i>	FJ169929	GQ452825
23.	FHHMB: OV 10-1	<i>B. bifidum</i>	FJ169932	FJ357021
24.	FHHMB: OV 10-3	<i>B. ruminantium</i>	FJ169933	GQ452826
25.	FHHMB: OV 10-5	<i>B. ruminantium</i>	FJ169934	GQ452827
26.	FHHMB: OV 11	<i>B. longum / pseudocatenulatum</i>	FJ169935	FJ357022
27.	FHHMB: OV 12	<i>B. breve</i>	EU272015	EU272021
28.	FHHMB: OV 13	<i>B. longum / pseudocatenulatum</i>	FJ169936	FJ357023
29.	FHHMB: OV 14-1	<i>B. breve</i>	FJ169937	FJ357024
30.	FHHMB: OV 16	<i>B. adolescentis</i>	FJ169938	FJ357025

4. Изучение видовой пейзажа бифидобактерий, выделенных от детей двух возрастных групп.

Анализ выборки штаммов бифидобактерий, выделенных от детей на основе генотипирования, продемонстрировал существенное различие в видовом разнообразии бифидофлоры детей двух возрастных групп (рис. 1). У детей младшей возрастной группы выделены штаммы 8 видов бифидобактерий, от старшей группы – только 3-х видов.

Младшую группу детей можно подразделить на две подгруппы:

1) в которой индигенная бифидофлора выделялась в количествах, соответствующих норме - 10^{9-10} КОЕ/мл; 2) подгруппа детей, у которых количество индигенной бифидофлоры было значительно ниже нормативных показателей, но после проведения коррекции нормобиоценоза синбиотическим препаратом «Бифидум-Мульти-1» содержание бифидобактерий было восстановлено до нормы.

На рисунках 2А и 2Б представлен видовой пейзаж каждой подгруппы. Как видно из рисунка 2 А, у детей первой подгруппы преобладают штаммы вида *B. bifidum* (20%), которые прослеживаются во всех возрастах от 1 до 18 месяцев. Для ЖКТ этих детей характерными также были виды *B. pseudocatenulatum* (17%), *B. angulatum* (3%), *B. longum* (3%), *B. adolescentis* (14%).

У детей второй подгруппы доминирующим является вид *B. ruminantium*, который отмечался у детей 3,5 – 5 месяцев. У ребенка, старшего по возрасту (6,5 мес.), обнаружен вид *B. adolescentis*. У младшей подгруппы детей также были выделены штаммы вида *B. breve*, характерного именно для детей первых месяцев жизни. Штаммы природного рекомбинанта *B. longum* / *pseudocatenulatum* также выявлены только в этой подгруппе и обнаружены у двух детей - 4 и 5 месяцев. У детей обеих подгрупп младшей группы дополнительно обнаружены бифидобактерии видов *B. pseudocatenulatum* и *B. bifidum*. Большая доля штаммов вида *B. pseudocatenulatum* может свидетельствовать об их адаптации к микробиоценозу ЖКТ детей младшей возрастной группы.

Полученные данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями (Young S.L., et al., 2004; Бондаренко В.М. и др., 2004, 2007; Шкоропов А.Н. и др., 2005, 2007; Рыбальченко О.В., 2008), свидетельствующих о значимости видов *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* для ЖКТ детей.

Исследование бифидофлоры детей, принимавших синбиотики, показало возможность восстановления собственной бифидофлоры у детей раннего возраста. В данный период жизни ребенка, который характеризуется незрелостью ферментативной системы, биоразнообразие бифидофлоры особенно важно, поэтому можно предположить, что проведение курсов приема пробиотиков или синбиотиков в этот период имеет значение для становления наиболее физиологичного микробиоценоза ЖКТ ребенка.

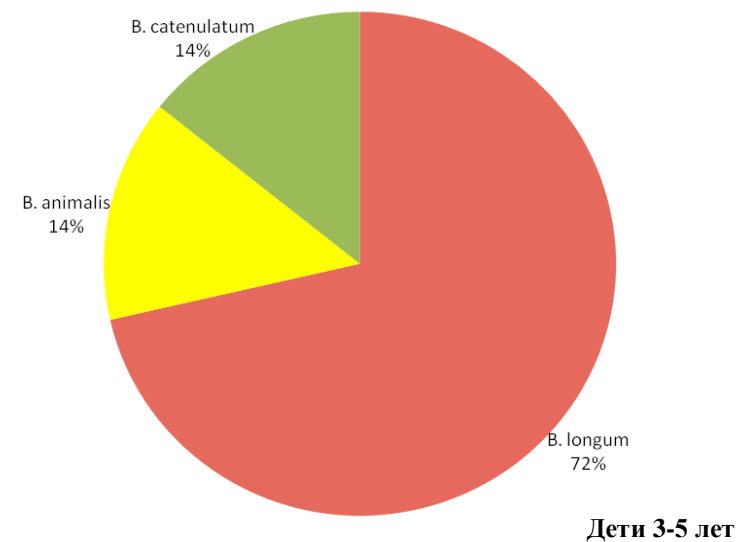
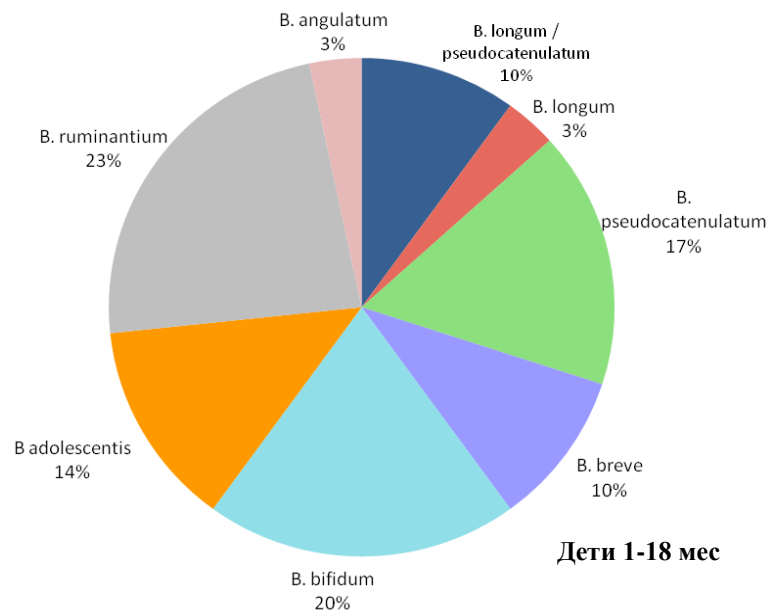


Рис. 1 Сравнение видового разнообразия бифидобактерий, выделенных от детей двух возрастных групп

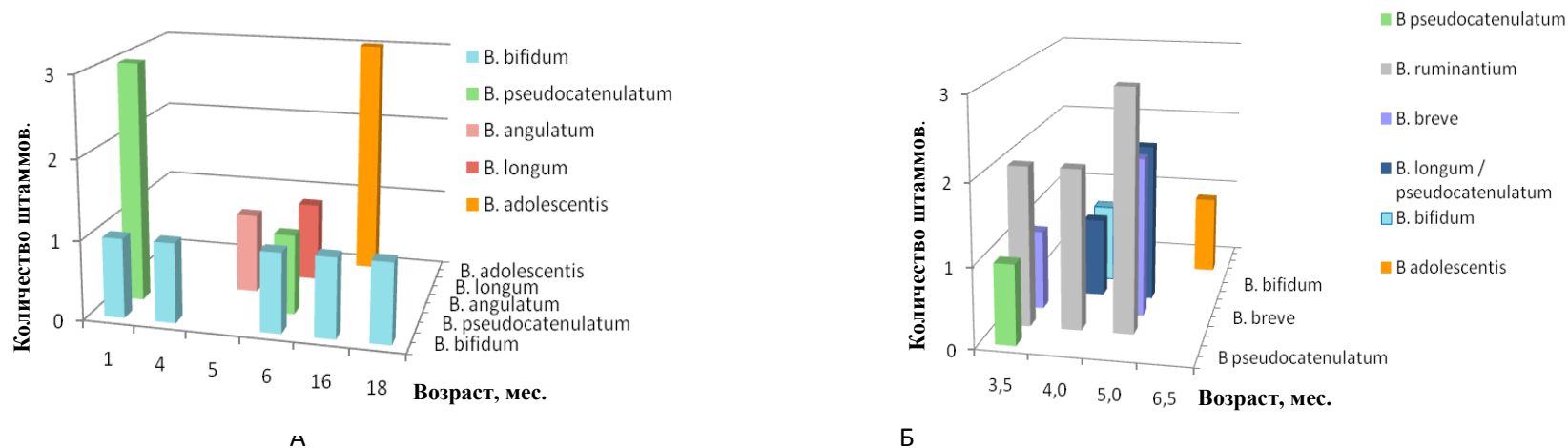


Рис. 2 (А) Виды бифидобактерий, представителей собственной бифидофлоры детей раннего возраста. (Б) Виды бифидобактерий, выделенных от детей раннего возраста, принимавших синбиотик «Бифидум-Мульти-1».

5. Формирования выборки потенциальных пробиотических штаммов.

По признаку доминирования в микробиоценозе детей младшей возрастной группы, на основании всестороннего изучения морфологических, физиолого-биохимических свойств, кинетики роста, динамики накопления органических кислот, способности сквашивать обезжиренное молоко, устойчивости к желчи, соли, безопасности для лабораторных животных было отобрано 7 штаммов бифидобактерий (OV2, OV7, OV12, OV15, OV17, OV19, OV20), перспективных для конструирования средств коррекции микрофлоры ЖКТ детей.

Важнейшим критерием отбора пробиотических штаммов является изучение их антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, которая обеспечивает колонизационную резистентность микробиоценоза ЖКТ. Отобранные штаммы характеризовались высокой антагонистической активностью, сравнимой с активностью референсных штаммов бифидобактерий, а у штамма *B. longum* OV20 - превышающую ее (таблица 6).

Таблица 6

Антагонистическая активность производственных и отобранных штаммов бифидобактерий по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам

Штаммы бифидобактерий	Значения зоны задержки роста патогенных и условно-патогенных бактерий, мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	<i>Shigella flexneri</i> 337	<i>Shigella sonnei</i> 177	<i>Proteus vulgaris</i> 1274	<i>Escherichia coli</i> 157
Производственные штаммы					
<i>B. bifidum</i> 791	15±2	20±5	20±2	20±2	16±3
<i>B. longum</i> B379M	26±1	33±1	28±2	31±1	27±1
<i>B. breve</i> 79-88	23±2	34±1	28±2	29±1	27±1
<i>B. adolescentis</i> ГО-13	19±2	28±2	28±2	27±3	24±2
<i>B. infantis</i> 73-15	14±1	25±2	19±1	22±3	18±3
Отобранные штаммы детей раннего возраста					
<i>B. pseudocatenulatum</i> OV2	25±3	34±5	30±5	31±2	27±5
<i>B. bifidum</i> OV7	15±2	20±2	20±3	19±3	16±3
<i>B. breve</i> OV12	20±3	28±3	26±5	28±2	26±3
<i>B. angulatum</i> OV15	26±3	30±2	31±3	32±3	26±4
<i>B. pseudocatenulatum</i> OV17	23±3	28±5	25±5	27±1	18±5
<i>B. bifidum</i> OV19	15±4	19±3	18±5	18±3	12±3
<i>B. longum</i> OV20	26±3	32±5	30±3	32±2	28±3

6. Исследование антибиотикорезистентности вновь выделенных штаммов.

Необходимым этапом селекции перспективных для производства штаммов, является изучение их чувствительности к антибиотикам, что важно для составления рациональных схем лечения и контроля за накоплением и распространением антибиотикоустойчивых форм бактерий.

Применение двух методов - двойных серийных разведений и диско-диффузионного метода - позволило предложить алгоритм испытания 36 антимикробных препаратов и определить для бифидобактерий пределы чувствительности к ним.

Метод определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антимикробных веществ позволил распределить исследуемые штаммы микроорганизмов по трем категориям: чувствительный, промежуточно-устойчивый и устойчивый.

Изучение к 36 антибиотикам показывало, что производственные и вновь выделенные штаммы бифидобактерий устойчивы к противогрибковым препаратам; полимиксину, хинолонам и фторхинолонам и чувствительны к 14 антимикробным веществам: пенициллинам (ампициллину, карбенициллину, азлоциллину); цефалоспорином 1 поколения (цефалотину); макролидам (эритромицину, кларитромицину, рокситромицину); линкозаминам (линкомицину и клиндамицину); гликопептиду (ванкомицину); хлорамфениколу и ансамицину (рифампицину). Учитывая, что данные признаки, присущие всему роду *Bifidobacterium*, тестирование по всем 36 антибиотикам важно при первичном изучении культур бифидобактерий.

Для дифференциации штаммов бифидобактерий внутри вида предложена сокращенная панель из 15 антибиотиков, относящихся к 8 группам антимикробных препаратов (таблица 7).

Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что отношение бифидобактерий к антибактериальным средствам можно рассматривать, как дополнительный диагностический признак рода *Bifidobacterium*, а индивидуальные свойства отдельных штаммов использовать как метки при дифференциации.

Таблица 7

Сравнение антибиотикорезистентности производственных штаммов бифидобактерий и штаммов, выделенных от детей раннего возраста.

№	Название антибиотика	Диаметр зоны ингибирования роста исследуемых штаммов, мм									
		<i>B. bifidum</i> 791	<i>B. bifidum</i> OV-7	<i>B. breve</i> 79-88	<i>B. breve</i> OV-12	<i>B. longum</i> B379M	<i>B. longum</i> OV-20	<i>B. infantis</i> 73-15	<i>B. adolescentis</i> ГО-13	<i>B. angulatum</i> OV-15	<i>B. ruminantium</i> OV-10-5
1	Оксациллин					0±0	12±0	24±2	31±2	12±0	24±2
2	Ампициллин			17±3	39±2	25±1	24±2	18±2	36±2	22±2	36±2
3	Цефазолин								31±2	16±1	12±2
4	Цефтазидим					18±2	30±0	28±2	33±1	20±2	36±2
5	Стрептомицин					19±2	0±0	12±2			
6	Неомицин			12±2	0±0				10±0	0±0	0±0
7	Канамицин	0±0	20±3			16±2	15±3	10±2			
8	Гентамицин	0±0	10±5	30±2	0±0	14±2	15±0	15±3	12±2	0±0	0±0
9	Амикацин			12±2	0±0	20±0	0±0	0±0			
10	Тетрациклин					10±2	30±0	23±1			
11	Доксициклин					10±0	32±0	22±2	30±2	25±2	34±2
12	Азитромицин			33±2	17±1				24±0	17±1	20±2
13	Ципрофлоксацин			0±0	10±0	13±2	16±2	14±2	16±2	10±0	30±2
14	Пефлоксацин			6±2	0±0	18±2	0±0	0±0	6±2	0±0	12±0
15	Ломефлоксацин	19±2	12±1	0±0	10±0	14±2	19±3	14±2	23±2	10±0	0±0

	чувствителен		промежуточно-устойчив		устойчив		высоко устойчив
--	--------------	--	-----------------------	--	----------	--	-----------------

Индивидуальные особенности штаммов в отношении к антибиотикам целесообразно использовать при конструировании препаратов на основе консорциумов штаммов, расширяя таким образом спектр их антибиотикорезистентности.

7. Изучение штаммов бифидобактерий при совместном культивировании.

Как уже было показано ранее (Поспелова В.В., 2000; Амерханова А.М. 2009), наиболее приоритетным в сравнении с другими подходами к конструированию пробиотических препаратов, является принцип консорциума

- научно обоснованное и биотехнологически выверенное комбинирование культур пробиотических микроорганизмов.

При совместном культивировании производственных и новых штаммов бифидобактерий отсутствовал взаимный антагонизм бифидобактерий. Сравнение характеристик штаммов в индивидуальных культурах (таблица 8) с показателями в консорциумах (таблица 9).

Таблица 8

Культуральные свойства штаммов при раздельном выращивании

Название штамма	Концентрация клеток в бульонной 24 ч. культуре, КОЕ/мл	Значение кислотности бульонной 24 ч. культуры, °Т
<i>B. bifidum</i> 791	3,0 x 10 ⁸	180
<i>B. pseudocatenulatum</i> OV-2	2,5 x 10 ⁸	210
<i>B. breve</i> –OV-12	2,0 x 10 ⁸	210
<i>B. bifidum</i> -OV-7	2,0 x 10 ⁸	180

Таблица 9

Результаты совместного культивирования штаммов бифидобактерий в консорциумах

Штаммы	Концентрация клеток, КОЕ/мл				Кислотность совместной культуры, °Т
	<i>B. bifidum</i> ГКНМ 791	<i>B. pseudocatenulatum</i> OV2	<i>B. breve</i> OV12	<i>B. bifidum</i> OV7	
Двухкомпонентный консорциум					
ГКНМ 791+OV7	8,0 x 10 ⁸	-	-	8,0 x 10 ⁸	194
ГКНМ 791+ OV12	7,0 x 10 ⁸	-	6,5 x 10 ⁸	-	196
Трехкомпонентный консорциум					
ГКНМ 791+ OV2+ OV7	1,0 x 10 ⁹	7,0 x 10 ⁸	-	7,0 x 10 ⁸	196
ГКНМ 791 + OV12+ OV7	6,5 x 10 ⁸	-	8,0 x 10 ⁸	7,0 x 10 ⁸	198
ГКНМ 791+ OV2+ OV12	7,2 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁸	8,3 x 10 ⁸	-	194
Четырехкомпонентный консорциум					
ГКНМ 791+ OV2+ OV12+ OV7	1,5 x 10 ⁹	7,0 x 10 ⁸	7,4 x 10 ⁸	7,0 x 10 ⁸	198

Показана возможность сокультивирования отобранных штаммов бифидобактерий в двух-, трех- и 4-х-компонентных консорциумах. Отмечено положительное влияние при совместном культивировании штаммов друг на друга, которое проявлялось в большем накоплении биомассы и устойчивости их к органическим кислотам, увеличении сроков хранения комплексных препаратов, а также активации физиолого-биохимической активности бифидобактерий, выделенных от детей раннего возраста. Совместное культивирование новых штаммов бифидобактерий в сочетании с производственным штаммом ГКНМ 791 показало увеличение биохимической активности штамма OV-2 в способности сбрасывать субстраты - с 4-х до 13-ти (таблица 10).

Морфологические отличия формы колоний штаммов бифидобактерий, стабильно сохраняющиеся при выращивании в совместной культуре на полужидкой среде, позволили количественно оценивать каждый штамм в консорциуме (рис. 3).

Исследование бифидофлоры детей, принимавших синбиотики, показало возможность коррекции собственной бифидофлоры у детей раннего возраста. В данный период жизни ребенка, который характеризуется незрелостью ферментативной системы, биоразнообразии бифидофлоры особенно важно, поэтому можно предположить, что проведение курсов приема пробиотиков или синбиотиков в этот период имеет значение для становления наиболее физиологичного микробиоценоза ЖКТ ребенка.

Таким образом, от здоровых детей выделено 287 культур, которые по дифференциальным признакам отнесены к роду *Bifidobacterium*. Всесторонне охарактеризованные 37 штаммов бифидобактерий депонированы в Государственной коллекции нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. Из них 7 штаммов бифидобактерий *B.bifidum* OV-7, *B. angulatum* OV-15, *B. pseudocatenulatum* OV-17, *B. bifidum* OV-19, *B. longum* OV-20, *B. breve* OV-12, *B.pseudocatenulatum* OV-2 запатентованы и готовы к производственным испытаниям.

Таблица 10
Физиологическая активность штаммов ГКНМ 791 и OV2
по данным ANAERObtest-23

Активный ингредиент	ГКНМ 791	OV2	OV2 после совместного культивирования с ГКНМ 791
L-рамноза	+	0	0
D-галактоза	+	±	+
D-глюкоза	+	0	+
D-фруктоза	+	0	+
D-лактоза	+	+	+
D-сахароза		0	±
D-мальтоза		0	+
D-раффиноза		0	0
L-арабиноза	±	±	±
D-ксилоза	±	±	±
салицин		0	+
D-целлобиоза		0	+
D-манноза		0	+
D-трегалоза	±	0	+
D-меллецитоза		0	0
D-маннит		0	+
D-сорбитол	+	0	±



Рис. 3. Штаммы OV2 и ГКНМ 791
при совместном культивировании на
полужидкой БС среде

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая комплексная технология выделения и изучения фенотипических свойств бифидобактерий и их молекулярно-генетической идентификации, что явилось основой для селекции штаммов, перспективных для конструирования пробиотических препаратов, а также для ведения коллекционных и производственных культур.

2. Определен видовой состав бифидофлоры детей с использованием метода генотипирования на основе секвенирования фрагментов двух генов: *16S rDNA* и *tal*. Показано большее разнообразие видов в младшей группе детей, у которых выделены бифидобактерии видов: *B. angulatum* (3%), *B. pseudocatenulatum* (17%), *B. longum/pseudocatenulatum* (10%), *B. longum* (3%), *B. breve* (10%), *B. bifidum* (20%), *B. adolescentis* (14%), *B. ruminantium* (23%). У старшей группы идентифицировано только три вида: *B. longum* (72 %), *B. animalis* (14 %), *B. catenulatum* (14%), что коррелирует с состоянием ферментативной системы разных возрастных групп. Биоразнообразие видов в младшей группе компенсирует незрелость ферментативной системы в данный возрастной период. В старшей группе детей выделение 3-х видов, отличающихся высокой биохимической активностью, коррелирует с большей зрелостью ЖКТ и сменой видов в процессе сукцессии в силу их экологического преимущества.

3. Выявление оптимальной сахаролитической активности штаммов бифидобактерий возможно при использовании системы ANAEROtest-23 (PLIVA-Lachema Diagnostica s.r.o., Чешская Республика). Весь цикл селекции и изучения штаммов бифидобактерий необходимо проводить на стандартизированной среде для культивирования и выделения бифидобактерий (ГНЦ НИИ прикладной микробиологии, г. Оболенск), в наибольшей степени учитывающей метаболические потребности бактерий этого рода.

4. На основании изучения антибиотикорезистентности бифидобактерий для дифференциации штаммов впервые предложена панель из 15 противомикробных препаратов: *пенициллины* – оксациллин, ампициллин; *цефалоспорины 1 поколения* – цефазолин; *цефалоспорины 3 поколения* – цефтазидим; *аминогликозиды 1 поколения* – стрептомицин, неомицин, канамицин; *аминогликозид 2 поколения* – гентамицин; *аминогликозид 3-го поколения* – амикацин; *тетрациклины* – тетрациклин, доксициклин; *макролиды* – азитромицин и *фторхинолоны* – цiproфлоксацин, пефлоксацин и ломефлоксацин. Антибиотикорезистентность является дополнительным признаком дифференциации штаммов.

5. Изучение видового разнообразия бифидофлоры детей раннего возраста позволило отобрать 7 штаммов (*B. angulatum* OV-15, *B. pseudocatenulatum* OV-17, *B. pseudocatenulatum* OV-2, *B. longum* OV-20, *B. breve* OV-12, *B. bifidum* OV-7,

B. bifidum OV-19) с определенными физиолого-биохимическими свойствами, наиболее физиологичными для ЖКТ детей этого возраста, обладающих высокой антагонистической активностью, антибиотикорезистентностью, безопасностью и перспективных для конструирования пробиотических препаратов. На отобранные штаммы получены патенты РФ.

6. На основе референсных и вновь отобранных штаммов сконструированы консорциумы по принципу синбиоза. В консорциумах показано проявление синергидного эффекта в накоплении биомассы, повышении устойчивости к кислотам и активации биохимических показателей всех включенных в них штаммов.

7. Отработаны критерии дифференцирования различных штаммов в консорциуме и их количественного учета, основанные на морфологических различиях колоний бифидобактерий при совместном культивировании. Это решает вопрос производственного контроля состава консорциума.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанные в настоящем исследовании подходы к определению биохимической активности и спектра антибиотикорезистентности бифидобактерий в комплексе с молекулярно-генетическим типированием на основе секвенирования фрагментов двух генов могут быть рекомендованы к использованию при идентификации вновь выделенных штаммов и ведении коллекционных и производственных культур бифидобактерий.

2. Для дифференциации штаммов бифидобактерий внутри вида предложена сокращенная панель из 15 антибиотиков, относящихся к 8 группам антимикробных препаратов.

3. Последовательности фрагментов генов 37 штаммов бифидобактерий, зарегистрированные в GenBank, существенно дополнили имеющуюся базу данных по исследуемым мишеням.

4. Запатентованные производственно-значимые штаммы OV2, OV7, OV12, OV15, OV17, OV- 19, OV-20.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Феклисова Л.В. Микробиоценоз слизистых оболочек ротоглотки и кишечника у детей, посещающих детские сады / Е.Р. Мескина, А.М. Амерханова, **О.Г. Жиленкова**, Е.А. Воропаева, Л.В. Пожалостина, К.Д. Моисеева и др. // Сборник материалов международной конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы» - М., - 2004. – С. 76.
2. **Амерханова А.М. Опыт применения БАД к пище «Бифидумбактерин Мульти» в педиатрической практике / А.Е. Лаврова, Г.В. Дмитриева, И.А. Пырикова, Е.С. Зубкова, О.Г. Жиленкова, А.А. Кураленко // Вестник Российской АМН. – 2005. - № 12. - С.30-32.**
3. **Карзанова М.Е. Определение видовой принадлежности штаммов бифидобактерий на основе секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и трансальдолазы / О.Л. Воронина, В.Г. Лунин, О.Г. Жиленкова, А.М. Амерханова // Доклады Россельхозакадемии. – 2006. - №5. - С. 9-12**
4. **Амерханова А.М Принципы конструирования препаратов-синбиотиков и оценка их клинической эффективности/ В.А. Алешкин, Н.М. Грачева, М.С. Петрова, О.П. Попова, Е.С. Зубкова, О.Г. Жиленкова, А.А. Кураленко, А.И. Соловьева // Вестник Российской АМН. – 2006. - № 6. - С. 38-45.**
5. Мескина Е.Р. Состояние микрофлоры кишечника у детей, посещающих дошкольное учреждение / А.М. Амерханова, Л.В. Пожалостина, **О.Г. Жиленкова** // Сборник научно-практических работ «Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению детей в амбулаторных условиях». К 30-летию ФГУ «Поликлиника консультативно-диагностическая» - М., 2006. - С. 104-112.
6. Феклисова Л.В. Состояние микробиоценоза кишечника у детей, посещающих дошкольные учреждения, и возможность коррекции нарушений при использовании синбиотика Бифидум-Мульти-2 / А.М. Амерханова, Е.Р. Мескина, **О.Г. Жиленкова**, Л.В. Пожалостина // Сборник работ Всероссийской научно-практической конференции «Этапная реабилитация и профилактика инфекционных заболеваний у детей» - С-Петербург. - 2006. - С, 75.
7. Феклисова Л.В. Микробиоценоз слизистых оболочек ротоглотки и кишечника детей, посещающих детские сады / Е.Р. Мескина, А.М. Амерханова, **О.Г. Жиленкова**, Е.А. Воропаева, Л.В. Пожалостина, К.Д. Моисеева, Т.А. Данилкова, Л.А. Омельченко, В.Д. Галкина // Сборник работ Всероссийской научно-практической конференции «Этапная реабилитация и профилактика инфекционных заболеваний у детей» - С-Петербург - 2006. - С.76.
8. Феклисова Л.В. Новые препараты-синбиотики для коррекции микрофлоры у детей разных возрастных групп / Е.Р. Мескина, А.М. Амерханова, **О.Г. Жиленкова** // Журнал «Ремедиум Приволжья». - 2006. - № 6. - С. 53.
9. Мескина Е.Р. Состояние микрофлоры кишечника у детей, посещающих дошкольное учреждение / А.М. Амерханова, Л.В. Пожалостина, **О.Г. Жиленкова**, К.Д. Моисеева // Сборник научно-практических работ под редакцией Л.В.Феклисовой - 2006. - С. 104-112.

10. **Феклисова Л.В.** Возможности применения синбиотиков для снижения заболеваемости часто болеющих детей, посещающих дошкольные учреждения / А.М. Амерханова, О.Г. Жиленкова, Е.Р. Мескина, Е.А. Воропаева, Л.В. Пожалостина, Е.С. Зубкова, А.А. Кураленко, К.Д. Моисеева // **Вопросы практической педиатрии.** – 2007. - № 2(6). - С. 53-59.
11. Амерханова А.М. Роль пробиотических микроорганизмов в современных технологиях профилактической и восстановительной медицины и возможности повышения эффективности препаратов на их основе / В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, **О.Г. Жиленкова**, С.А. Лисунова, Е.С. Зубкова, А.А. Кураленко // Сборник «Новые лекарственные средства» - М., - 2007. - вып.4. - С. 4-7.
12. Феклисова Л.В. Состояние микрофлоры кишечника и ротоглотки у детей детских дошкольных учреждений, возможность коррекции синбиотиком Бифидум-Мульти-2 / А.М. Амерханова, Е.Р. Мескина, **О.Г. Жиленкова**, Е.С. Зубкова, А.А. Кураленко, Л.В. Пожалостина, Е.А. Воропаева, К.Д. Моисеева // Сборник «Новые лекарственные средства» - М., - 2007, - вып.4. - С. 20-22.
13. Воронина О.Л. Дифференцирование видов бифидобактерий на основе секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и трансальдолазы / М.Е. Субботина, В.Г. Лунин, **О.Г. Жиленкова**, А.М. Амерханова // Клиническое питание (Материалы Международного конгресса "Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты" Санкт-Петербург, 14 - 16 мая 2007 года (в рамках 9-го Международного Славяно-Балтийского научного форума "Сакт-Петербург - Гастро 2007")), -2007, - № 1-2, - С. А31.
14. **Жиленкова О.Г.** Чувствительность к антибактериальным препаратам производственных штаммов бифидо- и лактобактерий / С.А. Лисунова, А.М. Амерханова, Е.С. Зубкова, А.А. Кураленко // Материалы Международного конгресса "Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты" Санкт-Петербург, 14 - 16 мая 2007 года (в рамках 9-го Международного Славяно-Балтийского научного форума "Сакт-Петербург - Гастро 2007"). -2007, - № 1-2, - С. 151.
15. Мескина Е.Р. Новые пути оптимальной коррекции микробиологических нарушений кишечника у детей / Л.В. Феклисова, А.М. Амерханова, **О.Г. Жиленкова**, Л.В. Пожалостина // Сборник материалов III ежегодной Московской конференции с участием регионов России и стран СНГ «Гнойно-септические заболевания у детей» - М., - 2007. – С. 107-108.
16. Давыдкин В.Ю., Спектр антибиотикочувствительности производственных штаммов бифидобактерий к антимикробным препаратам / И.Ю. Давыдкин, **О.Г. Жиленкова**, А.Л. Байракова, О.И. Рубальский, А.В. Мелихова // Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов - М., - 2007, 2. – С. 297-298.
17. Воронина О.Л. Анализ видового разнообразия бифидофлоры детей раннего возраста и влияние синбиотика «Бифидум-Мульти-1» на становление и развитие бифидобактерий детского кишечника / М.С. Кунда, М.Е. Субботина, **О.Г. Жиленкова**, А.М. Амерханова, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин // **Вопросы детской диетологии.** – 2008. - № 6(5). - С. 59-64.

18. Мескина Е.Р. Некоторые клинические аспекты состояния микробиологических биотопов ротоглотки и кишечника у организованных дошкольников / А.М. Амерханова, Л.В. Пожалостина, Е.А. Воропаева, **О.Г. Жиленкова** // Материалы научно-практической конференции, посвященной 50-летию детского инфекционного отделения МОНИКИ - М., - 2008. – С. 200-207.
19. Амерханова А.М. Воплощение идей Мечникова И.И. в разработках МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского / **О.Г. Жиленкова**, О.Л. Воронина, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин // Юбилейный Пятый Московский международный конгресс "БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития. - 16-20 марта 2009 г.
20. Амерханова А.М., Изучение динамики культивирования бифидобактерий в составе консорциума. / Е.С. Зубкова, С.А. Лисунова, **О.Г. Жиленкова**, А.А. Кураленко // Материалы 2-го Международного конгресса по пробиотикам 6-ой Объединенной научной сессии Института гастроэнтерологии и клинической фармакологии СПбГМА им. И.И.Мечникова, ФГУП «Гос НИИИ ОЧБ» ФМБА России, ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского и ФГУ ВГНКИ «Санкт-Петербург- Пробиотики-2009» Санкт-Петербург. - 2009. - № 4-. М2. - С. А 4.
21. Давыдкин В.Ю. Некоторые аспекты культивирования бифидобактерий / **О.Г. Жиленкова**, И.Ю. Давыдкин // Материалы юбилейной Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. - Нижний Новгород. - 2009. – С. 340.
22. Амерханова А.М Роль бифидофлоры в жизнеобеспечении организма ребенка и факторы, определяющие ее формирование / О.Л. Воронина, **О.Г. Жиленкова**, А.В. Алешкин, С.А. Лисунова, Е.С. Зубкова, А.А. Романова, М.Е. Субботина, М.С. Кунда // Вопросы детской диетологии. – 2010. - № 8 (3).- С. 22-29.
23. Воронина О.Л. Анализ видового разнообразия бифидобактерий на основе секвенирования фрагментов пяти генов «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» / М.С. Кунда, В.В. Биткина, М.Е. Субботина, **О.Г. Жиленкова**, А.М. Амерханова. – Минск.- 31.05- 04.06.2010.
24. Тутельян В.А./ С.А.Шевелева, С.А. Хотимченко, В.А. Исаков, И.Я. Конь, В.К. Мазо, Н.Р. Ефимочкина, Э.Н. Трушина, С.Ю. Батищева, А.В. Черкашин, В.А. Алешкин, Б.А. Шендеров, А.М. Амерханова, **О.Г. Жиленкова**, М.С. Бляхер, И.М. Федорова, Е.А. Воропаева, Ю.Ю. Черепанова, Ю.Н.Урбан, А.Л. Гинзбург, Н.А. Зигангирова, Б.С. Народицкий, Л.Н. Нестеренко, И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха, Ю.В. Ананьина, Н.К. Янковский, В.Н. Даниленко, С.Г. Ботина, О.К. Аверина, В.В. Зинченко, Е.А. Карбышева, В.Д. Харитонов, В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, В.Г. Будрик, С.П. Синеокий, А.И. Туркин, Я.В. Иванова / Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. // Методические указания.- М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора,- 2010.- 91 с. (утверждено лабораторным советом Роспотребнадзора 18.06.2010).
25. Voronina O.L. Intastinal bifidoflora of children - the indicator of chandge in ecological conditions / M.S. Kunda, M.E. Subbotina M.E **O.G. Zhilenkova**, A.M. Amerkhaniva // From experimental biology to preventive and integrative medicine. Proceedings of

International Interdisciplinary Symposium 2008 Международный Междисциплинарный Симпозиум «От экспериментальной биологии к превентивной интегративной медицине». - Судак, Крым, Украина 19-30 сентября 2008 г. - С.32-34.

26. Voronina O.L. Polymorphism of bifidobacteria genes in *Bifidobacterium adolescentis* group / M.S. Kunda, M.E. V.V. Bitkina, **O.G. Zhilenkova**, A.M. Amerkhaniva // XXXII International Congress of the Society of Microbial Ecology and Disease. -St-Petersburg, Russia, -October 29-30 2009. - P. A30.
27. Voronina O.L. The analysis of genetic similarity of *Bifidobacterium ruminantium* strains, isolated from early age infants and from cow's milk / M.S. Kunda, V.V. Bitkina, **O.G. Zhilenkova**, A.M. Amerkhaniva // XXXII International Congress of the Society of Microbial Ecology and Disease.- St-Petersburg – Probiotics 2009, St-Petersburg, Russia, October 28-30 2009. - P. A 30-A 31.
28. **Zhilenkova O.G.** Study of antibiotic resistance in bifidobacteria strains deposited in the bank / M.E. Subbotina, S.A. Lisunova, O.L. Voronina, A.M. Amerkhanova // XXXII International Congress of the Society of Microbial Ecology and Disease.- St-Petersburg, Russia,- October 29-30 2009. - P. A 32.
29. **Zhilenkova O.G.** Comparative characterization of biochemical test systems used for specific identification of bifidobacteria / S.A Lisunova, E.S., Zubkova, A.A. Kuralenko, A.M. Amerkhanova // XXXII International Congress of the Society of Microbial Ecology and Disease.- St-Petersburg – Probiotics 2009, St-Petersburg, Russia, - October 28-30 2009. - P. A32.
30. Voronina O.L, Genotyping in decision of problem of *Bifidobacterium* species identification by biochemical approach / M.S. Kunda, M.E. V.V. Bitkina, **O.G. Zhilenkova**, A.M. Amerkhaniva // Конференция «Молекулярная Филогенетика MolPhy-2» МГУ им. М.В. Ломоносова. - Москва, 18.05.2010 – 21.05.2010
31. Voronina O.L. The searching of *Bifidobacterium infantis* in present-day first year infants / M.S. Kunda, M.E. V.V. Bitkina, **O.G. Zhilenkova**, A.M. Amerkhaniva // International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC2010, - Kosice, Slovakia, - 15-17 June 2010.- P. 161-162.

Патенты:

1. Патент РФ № 2375443 от 10.12.2009 Штамм *Bifidobacterium bifidum* OV-7 используемый для получения бактериальных препаратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств /Алешкин В.А., Амерханова А.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Субботина М.Е., Кунда М.С.; заявитель и патентообладатель: ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.- заявка № 2008128541 от 15.07.2008.
2. Патент РФ № 2373277 от 20.11.2009 Штамм *Bifidobacterium angulatum* OV-15, используемый для получения бактериальных препаратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств /Алешкин В.А., Амерханова А.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Субботина М.Е., Кунда М.С.; заявитель и патентообладатель: ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.- заявка № 2008128544 от 15.07.2008.

3. Патент РФ № 2373275 от 20.11.2009 Штамм *Bifidobacterium pseudocatenulatum* OV-17, используемый для получения бактериальных препаратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств /Алешкин В.А., Амерханова А.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Субботина М.Е., Кунда М.С.; заявитель и патентообладатель: ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.- заявка № 2008128543 от 15.07.2008.
4. Патент РФ № 2375444 от 10.12.2009 Штамм *Bifidobacterium bifidum* OV-19, используемый для получения бактериальных препаратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств /Алешкин В.А., Амерханова А.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Субботина М.Е., Кунда М.С.; заявитель и патентообладатель: ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. - заявка № 2008128540 от 15.07.2008.
5. Патент РФ № 2375445 от 10.12.2009 Штамм *Bifidobacterium longum* OV-20, используемый для получения бактериальных препаратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств /Алешкин В.А., Амерханова А.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Субботина М.Е., Кунда М.С.; заявитель и патентообладатель: ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.- заявка № 2008128542 от 15.07.2008.
6. Патент РФ № 2373274 от 20.11.2009 Штамм *Bifidobacterium breve* OV-12, используемый для получения бактериальных препаратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств / Алешкин В.А., Амерханова А.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Субботина М.Е., Кунда М.С.; заявитель и патентообладатель: ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.- заявка № 2008128539 от 15.07.2008.
7. Патент РФ № 2373278 от 20.11.2009 Штамм *Bifidobacterium pseudocatenulatum* OV-2, используемый для получения бактериальных препаратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств /Алешкин В.А., Амерханова А.М., Афанасьев С.С., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Субботина М.Е., Кунда М.С.; заявитель и патентообладатель: ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.- заявка № 2008128545/13 от 15.07.2008.

Список сокращений, используемых в тексте

БАД – биологически активная добавка к пище

БС – среда для культивирования бифидобактерий производства Государственного научного центра прикладной микробиологии г.Оболенск

ГКНМ – Государственная коллекция нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

ГМ - среда – гидролизатно-молочная среда

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СанПиН - Санитарные нормы и правила

ATCC (American Type Culture Collection) – американская коллекция типовых культур

DSM (Deutsche Sammlung von Microorganismen and Zellkulturen) – немецкая коллекция микроорганизмов

dNTP - дезоксирибонуклеозидтрифосфаты

ddNTP – дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты

JCM (Japan Culture Collection of Microorganism) – японская коллекция микроорганизмов

16S рРНК – 16S рибосомальная РНК

tal –трансальдолаза (transaldolase)