

6. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Киреев М.П., Федорова В.А., Аленкина Т.В. и др. Новый способ получения О-антигена холерного, очищенного с целью создания холерных диагностических антисывороток. *Биотехнология*. 2002; 2: 42–6.
7. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285–03. *Бюллетень нормативных и методических документов*. М.: Госсанэпиднадзор; 2003; 3 (13): 61–144.

REFERENCES

1. Letter of Rospotrebnadzor from 06.04.2012 № 01/3540-12-32 "On the epidemic situation of cholera in the world and to predict the incidence of cholera in 2012". Available at: http://rospotrebnadzor.ru/rss_all/-/asset_publisher/Kq6J/content/id/1211733/ (in Russian).
2. Laboratory diagnosis of cholera: Methodical instructions MUK 4.2.2218–07. Moscow: Federal'nyy tsentr gigeny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2007. (in Russian)
3. Jin Da-Zhi, Xu Xiao-Jing, Chen Su-Hong, Wen Si-Yuan, Ma Xue-En, Zhang Zheng et al. Detection and identification of enterohemorrhagic

- Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *Infectious Agents and Cancer*. 2007; 2: 23–33.
4. Panicker G., Call D.R., Krug M.J., Bej A.K. Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. In Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. *Appl. and Environmental Microbiology*. 2004; 70 (12): 7436–44.
5. Vora G.J., Meador C.E., Bird M.M., Bopp C.A., Andreadis J.D., Stenger D.A. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *PNAS*. 2005; 102 (52): 19 109–14.
6. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Kireev M.P., Fedorova V.A., Alenkina T.V. et al. A new method of obtaining O-antigen of cholera and purified with the purpose of creation of cholera diagnostic antiserum. *Biotekhnologiya*. 2002; 2: 42–6. (in Russian)
7. Safety of work with microorganisms of I-II groups of pathogenicity. Sanitary-epidemiological rules SP 1.3.1285-03. *Bulleten' normativnykh i metodicheskikh dokumentov*. Moscow: Gossanepidnadzor; 2003; 3 (13): 61–144. (in Russian)

Поступила 26.03.14

Received 26.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.873.13:579.253:615.281

Беляева Е.А.¹, Червинец Ю.В.¹, Червинец В.М.¹, Трошин А.В.¹, Миронов А.Ю.², Незаметдинова В.З.³, Аверина О.В.³, Даниленко В.Н.³

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ РОДА *BIFIDOBACTERIUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕГИОНА РОССИИ

¹ГБОУ ВПО «Тверская ГМА» Минздрава России, 170100, Тверь; ²ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», Москва; ³«Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, 119991, Москва

Из 156 образцов фекалий, полученных от здоровых коренных жителей Центрального региона России, сформирована коллекция из 87 штаммов бифидобактерий, из которых отобрано 5 штаммов с широкой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Отобранные штаммы характеризуются высоким пробиотическим потенциалом; обладают адгезивными свойствами и чувствительностью к антибиотикам и химиопрепаратам, соответствующими основным требованиям общих фармакопейных статей к штаммам микроорганизмов, используемых в производстве пробиотиков для медицинского применения. Данные штаммы бифидобактерий могут быть рекомендованы для создания эффективных пробиотических лекарственных препаратов, ориентированных на жителей Центрального региона России.

Ключевые слова: бифидобактерии; региональные пробиотические фармпрепараты.

Beliaeva E.A.¹, Chervinets Yu.V.¹, Chervinets V.M.¹, Troshin A.V.¹, Mironov A.Yu.², Nezametdinova V.Z.³, Averina O.V.³, Danilenko V.N.³

THE CHARACTERISTICS OF PROBIOTIC PROPERTIES OF STRAINS OF GENUS OF BIFIDOBACTERIUM SEPARATED FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF RESIDENTS OF THE CENTRAL REGION OF RUSSIA

¹The Tver state medical academy of Minzdrav of Russia, 170100, Tver, Russia; ²The G.N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology, 125212, Moscow, Russia; ³The N.I. Vavilov institute of general genetics of the Russian academy of sciences, 119991, Moscow, Russia

The 156 samples of feces separated from healthy residents of the Central region of Russia were used to compose collection of 87 strains of Bifidobacterium out of which 5 strains with wide antagonistic activity related to pathogenic and opportunistic microorganisms were selected. The selected strains are characterized by high probiotic potentials. They have adhesive properties and sensitivity to antibiotics and preparations corresponding to main requirements of common pharmacopoeia articles to strains of microorganisms used in production of probiotics for medicinal application. The given strains of Bifidobacterium can be recommended for development of effective probiotic pharmaceuticals directed to residents of the Central region of Russia.

Key words: *Bifidobacterium*; regional probiotic pharmaceutical

Для корреспонденции:

Беляева Екатерина Андреевна (Belyaeva Ekaterina Andreevna), ассистент каф. микробиологии.

Адрес: 170100, Тверь, ул. Советская, 4

E-mail: ebeliaeval@mail.ru

Введение. В последние годы наблюдается повышенный интерес к изучению бифидобактерий в связи с их пробиотическими свойствами и способностью положительно влиять на здоровье человека [1]. Бифидобактерии являются важнейшим компонентом микробиоты человека [2]. Они играют важную роль в процессах переваривания и усвоения пищи, синтезируют биологически активные вещества, подавляют патогенную микрофлору, оказывают выраженное иммуностимулирующее действие [3–9]. Сегодня большое внимание уделяется созданию новых фармпрепаратов на основе пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий [10–13]. Минздравом РФ в 2013 г. разработан новый комплекс общих фармакопейных статей (ОФС) (<http://www.rosminzdrav.ru/docs/mzsr/regulation/81>), определяющих основные требования к штаммам микроорганизмов, используемых в производстве пробиотиков для медицинского применения. Это должны быть производственные штаммы, выделенные из организма человека, с подтвержденным клиническим эффектом, депонированные в национальной или международной коллекции, идентифицированные до вида по фенотипическим признакам, охарактеризованные по физиолого-биохимическим свойствам, спектру антагонистической активности к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных культур; должны быть апатогенны и безопасны, не продуцировать ферменты патогенности [14–16]. Отбор новых перспективных пробиотических штаммов следует вести в соответствии с данными требованиями.

Важно, чтобы штаммы были генетически стабильны и сохраняли важные пробиотические свойства в процессе культивирования и производства пробиотиков для медицинского применения. Производственные штаммы, созданные несколько десятилетий назад, могут терять ряд генов в процессе многолетнего нахождения в лаборатории без соответствующего генетического и биологического контроля их свойств. При отборе новых штаммов рекомендуется проводить полногеномное секвенирование и контролировать генетическую стабильность [17, 18].

Ведутся интенсивные исследования микробиома человека, установлено существование трех энтеротипов микробиома в желудочно-кишечном тракте человека [19]. В результате исследований, проведенных в России, выявлены и другие энтеротипы, специфичные для российского населения [20]. Применение пробиотических препаратов может быть более эффективным при большей персонализации. Микробиота человека неодинакова у людей разных континентов, стран, регионов, так как существует тесная взаимосвязь между индигенной микрофлорой человека, его организмом и экзогенными факторами окружающей среды. Она зависит от генотипа, образа жизни, питания [19–21]. Показана связь между изменениями в микробиоте человека и развитием различных заболеваний [22, 23]. Создание эффективных пробиотиков, направленных на коррекцию микрофлоры как здоровых, так и больных людей, проживающих в определенном регионе, является актуальной задачей.

Приведенные данные позволяют сформулировать новый подход к получению пробиотических штаммов, в том числе бифидобактерий. Необходимо формировать новые коллекции штаммов бифидобактерий, выделенных от людей, проживающих в разных регионах России, проводить детальную характеристику штаммов современными биохимическими, генетическими, молекулярно-биологическими и иммунобиологическими методами, включая полногеномное секвенирование и аннотацию генома по комплексу ключевых генов. Отбирать перспективные для производства

пробиотических фармпрепаратов штаммы, предназначенные для жителей разных регионов нашей страны. На базе Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН в сотрудничестве с ГБОУ ВПО "Тверская ГМА" Минздрава России ведется работа по созданию криобанка образцов микробиоты кишечника человека, формируется коллекция штаммов бифидобактерий, выделенных от жителей различных регионов России, с целью получения новых пробиотических штаммов для производства современных лекарственных препаратов, адаптированных для населения конкретных регионов (региональные пробиотические фармпрепараты). Данная работа является первым этапом в осуществлении этой программы.

Цель исследования – выделить штаммы бифидобактерий от здоровых людей, проживающих в Центральном федеральном округе (ЦФО), сформировать коллекцию штаммов бифидобактерий, провести отбор антагонистически активных безопасных штаммов и их анализ в соответствии с требованиями ОФС по пробиотическим свойствам.

Таблица 1

Праймеры для генотипирования и определения пробиотических генов

Олигонуклеотид	Структура олигонуклеотида 5'–3'	Ожидаемый размер ПЦР фрагмента, нуклеотиды
Праймеры для видотипирования		
16SLN	GTG GAG GGT TCG ATT CTG GCT	1550
16SLC	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CCG	
Гидролиз олиго- и полисахаридов		
aeg N	AGT TCG GCG TTA TCC TTG C	
aeg C	TCG TGG GCA TAC ACC TTG G	248
eara N	CAA GCA CAG CAC CGA CTA CC	
eara C	GAA CGT CAT CTC GAC CTT GC	214
xynD N	GTGAAGTAGCTCGGTGTCTGC	
xynD C	AGG GTG CTT ACT CGT ATG AAG G	176
bgIC N	GTG CTC ATC AGC TCC AAG C	
bgIC C	GAA GGT GAT CGG CAG TCG	201
glu N	ACA AGC CAT TCC TGT TCA CC	
glu C	AAG TCG CAG AGG TTC CAT ACC	172
Адгезия		
lex N	TAC CAC ACA GCA GCT CAT CG	
lex C	GAA ACG GTC ACG AAC AGA CC	195
cpaF N	GTA CCG TCC AGG CTG ATT TC	
cpaF C	CCA GTT CAC CAT GTG CTA C	167
Иммуномодуляция		
sor N	CAC TTG GAA CAG ACC TCA CTA CC	
sor C	CAG TTG TTT GGC ATC AGT CG	207
epr N	CAG TTG TTT GGC ATC AGT CG	
epr C	TCC TCG TCC ACA AAG AAT GC	183
ser N	TAC TCT CCT GCT TCG ATG TGG	
ser C	TCT TCT TGA CGG TGG ATT GG	244
Синтез экзополисахаридов		
mrcB2 N	TGA ATG TGT GGG CTA TCT GG	
mrcB2 C	TGT TGG TGT TGT TGG ACA GG	249
Антиканцерогенная активность		
but N	CTG GAG AAG GCG ATG AAG G	
but C	GGT GTT CGT GGA CAG AAT CG	246

Таблица 2

Биохимические характеристики штаммов бифидобактерий

Биохимические свойства	<i>B. longum</i> 201	<i>B. longum</i> 264	<i>B. bifidum</i> 172	<i>B. adolescentis</i> 191	<i>B. angulatum</i> 212
Утилизация триптофана	-	-	-	-	-
Синтез уреазы	-	-	-	-	-
Утилизация глюкозы	+	+	+	+	+
Утилизация маннитола	-	+	-	-	+
Утилизация лактозы	+	+	+	+	+
Утилизация сахарозы	+	+	-	+	+
Утилизация мальтозы	+	+	-	+	+
Утилизация салицина	-	-	-	-	+
Утилизация ксилозы	+	-	+	-	+
Утилизация арабинозы	+	+	-	+	+
Разжижение желатина	-	-	-	-	-
Утилизация эскулина	-	-	-	-	-
Утилизация глицерола	-	-	-	-	-
Утилизация целлюлозы	-	-	-	-	-
Утилизация маннозы	+	-	-	-	-
Утилизация мелезитозы	+	+	-	+	-
Утилизация раффинозы	+	+	-	+	+
Утилизация сорбитола	-	+	-	-	-
Утилизация рамнозы	-	-	-	-	-
Утилизация трегалозы	-	-	-	-	-
Синтез каталазы	-	-	-	-	-

Материалы и методы. Материал для исследования – образцы фекалий 156 здоровых людей в возрасте от 18 лет до 21 года (120 девушек и 36 юношей), коренных жителей ЦФО (Тверская, Московская, Ярославская, Брянская и другие области). У всех испытуемых проводилось анкетирование с целью сбора информации о родословной, личных параметрах, месте проживания, типе питания. Все люди на момент обследования были клинически здоровы, не имели в анамнезе инфекционных и соматических заболеваний желудочно-кишечного тракта. Для выделения бифидобактерий использован Schaefer Agar (BBL®) с кровью с последующим культивированием в анаэробных условиях, посевом на селективную среду, содержащую антибиотик мупироцин (100 мкг/мл), и микроскопией для определения морфологических и тинкториальных свойств. Чистые культуры бифидобактерий выращивали

в Bifidobacterium Broth («HiMedia», Индия), на MRS-агаре («HiMedia», Индия) с добавлением 0,5 г/л цистеина («HiMedia», Индия). Культивирование проводили в анаэробных условиях (HiAnaerobic System – Mark III, АнаероHiGas Pack 3,5 L; «HiMedia», Индия) при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

Для выделения антагонистически активных штаммов бифидобактерий проведено первичное изучение их антагонизма по отношению к индикаторному штамму *Escherichia coli* BVK O₈₃ методом перпендикулярных штрихов на плотной питательной среде с отбором штаммов.

Биохимическая идентификация проводилась с помощью тест-системы api® 20A (bio Mérieux) и программного обеспечения API WEB.

Видотипирование и определение пробиотических генов проводились на базе Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Родовое и видовое генетическое типирование бифидобактерий проводилось методом амплификации (ПЦР) и последующего секвенирования последовательности гена 16S рНК. Наличие пробиотических генов изучали методом ПЦР. Праймеры для ПЦР синтезированы в ЗАО "Синтол" (Москва, Россия) (табл. 1). Амплификация ДНК проводилась с использованием набора реактивов "Амплификация" (Dialat Ltd., Москва, Россия) на приборе Терцик ТП 4-ПЦР 01 («ДНК-Технология», Россия). Реакционная смесь ПЦР для каждого гена (объем 25 мкл) содержала 50–75 нг геномной ДНК и по 5 пкМ каждого из соответствующей пары праймеров, а также 1,25 мкл DMSO и 2 мкл 50 мМ MgCl₂. Режим амплификации: нагрев в течение 5 мин при 95°C, затем 30 циклов – денатурация 1 мин при 94°C, отжиг 1 мин при 54–66°C (температура отжига подбиралась для каждой пары праймеров), достройка цепи 1 мин при 72°C, финальная достройка 5 мин при 72°C. Электрофорез продуктов амплификации ДНК проводили в горизонтальном агарозном геле в триборатном буфере. Использованы маркеры молекулярной массы Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва). Нуклеотидную последовательность ДНК определяли методом Сэнгера на приборе Applied Biosystem Genetic Analysator 3100.

Антагонистическая активность бифидобактерий изучена методом отсроченного антагонизма по отношению к тест-штаммам: *Staphylococcus aureus* 25923, *Candida albicans* 885-653, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* 415, *Shigella sonnei* I фазы 941, *Bacillus subtilis* 534 [24].

Для выявления факторов патогенности бифидобактерий определялось наличие лецитиназной, казеинолитической, уреазной, желатиназной, нуклеазной, каталазной, гемолитической активности [15].

Для определения факторов персистенции устанавливали степень адгезии микроорганизмов, пользуясь средним показателем адгезии (СПА) [15] на эритроцитах человека 0 (I) группы Rh⁺.

Чувствительность бифидобактерий к антимикробным препаратам (цефуроксиму, цефаклору, ципрофлоксацину, ванкомицину, фузидину, цефалотину, цефазолину, цефалексину, рокситромицину, клиндамицину, линезолиду, меропенему, оксациллину, эритромицину, линкомицину, рифампицину, бензилпенициллину, амикацину и гентамицину) определяли методом диффузии в агар на среде Muller-Hinton в соответствии с методиками, рекомендованными NCCLS, с помощью

Таблица 3

Пробиотические гены в геноме штаммов *B. longum* 201 и *B. longum* 264

Пробиотические гены	<i>B. longum</i> 201	<i>B. longum</i> 264
Гидролиз олиго- и полисахаридов		
Арабиногалактанэндо-β-галактозидаза	aeg	-
Эндо-1,4-β-ксилаза D	xynD	+
Эндо-1,5-α-L-арабинозидаза	eaga	+
Эндоглюканазы	bglC	+
β-глюкуронидаза	glu	+
Адгезия		
Белок, образующий фл-пили АТФазы	craF	+
Большой экзопротеин, вовлеченный в адгезию	lex	+
Иммуномодуляция		
Внеклеточный белок, вовлеченный в деградацию ксиланов и арабинана	erg	+
Сортазаподобный белок	sor	+
Ингибитор сериновой протеазы	ser	+
Синтез экзополисахаридов		
Мембранные карбокси-пептидазы	mrcB2	+
Антиканцерогенная активность		
Бутирил-СоА-дегидрогеназа	but	+

стандартных дисков фирмы BBL [25].

Для систематизации и обработки полученных данных создана база данных в формате Excel. Вычисляли средние значения, стандартное отклонение, стандартную ошибку.

Результаты и обсуждение. Из 156 образцов фекалий на основании морфологических, тинкториальных, культуральных свойств выделено 87 штаммов бифидобактерий. Сформирована коллекция штаммов бифидобактерий, полученных от здоровых жителей ЦФО России. Из 87 штаммов отобрано 5 антагонистически активных штаммов бифидобактерий, проявляющих антагонизм к индикаторному штамму *E. coli* BVK083. Генетическая идентификация определила видовую принадлежность данных штаммов как *Bifidobacterium longum* 201, *Bifidobacterium longum* 264, *Bifidobacterium bifidum* 172, *Bifidobacterium adolescentis* 191, *Bifidobacterium angulatum* 212. Биохимическая идентификация показала, что отобранные штаммы имеют разнообразие биохимические характеристики (табл. 2).

Для штаммов *B. longum* 201 и *B. longum* 264 проведен поиск важных генов, определяющих пробиотические свойства. Это гены, кодирующие эндо- и экзогликозидазы, участвующие в гидролизе олиго- и полисахаридов; гены, определяющие адгезивные и иммуномодулирующие свойства бактерий; гены, участвующие в снижении риска развития онкологических заболеваний. На основе базы данных аннотированных секвенированных геномов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) методами биоинформатического анализа в составе геномов штаммов бифидобактерий, относящихся к виду *B. longum*, выявлен и отобран для анализа ряд пробиотических генов, к которым подобраны праймеры, комплементарные к консервативным участкам генов (см. табл. 1).

Бифидобактерии имеют мощную ферментную систему, участвующую в процессах разрушения и утилизации олиго- и полисахаридов, входящих в состав пищевых растительных субстратов, не переваренных в верхних отделах желудочно-кишечного тракта человека [2]. Наиболее важными являются секретируемые гликозидазы, которые дают бактериям преимущество в конкуренции за пищевые субстраты в пределах занимаемой экологической ниши [26]. Наличие генов, кодирующих секретируемые гликозидазы, участвующие в гидролизе олиго- и полисахаридов, является важным фактором при отборе активных штаммов бифидобактерий. В исследуемых геномах проведен поиск генов: арабиногалактан эндо-β-галактозидазы (aeg), эндо-1,4-β-ксилазы (xynD), эндо-1,5-α-L-арабинозидазы (eaga); эндоглюканазы (bglC) и β-глюкуронидаза (glu). В обоих геномах найдены все исследуемые гены, кроме гена, кодирующего эндо-β-галактозидазу (табл. 3).

Способность к адгезии может рассматриваться как селективный критерий для отбора пробиотиков, поскольку позволяет им конкурировать с патогенными бактериями, вытесняя их с поверхности эпителия кишечника [27]. В проявлении способностей к адгезии у бифидобактерий участвует ряд генов. Для быстрого скрининга отобраны гены, кодирующие: белок, образующий фл-пили (craF) и большой экзопротеин, вовлеченный в адгезию (lex). ПЦР-анализ показал наличие обоих генов в составе исследуемых геномов (см. табл. 3).

Важным пробиотическим свойством является способность бактерий к иммуномодуляции. Иммуномодулирующим свойством обладают секретируемые или находящиеся на поверхности бактерий молекулы [28]. К ним можно отнести ген, участвующий в образовании пилей, мембранные карбоксипептидазы, участвующие в синтезе экзополисахаридов (mrcB2), гены, кодирующие секретируемые молекулы: внеклеточный белок, вовлеченный в деградацию ксиланов и арабинана (erg), сортазаподобный белок (sor), ингибитор сериновой протеазы (ser). Данные гены найдены в составе исследуемых геномов (см. табл. 3).

Важным пробиотическим свойством бактерий является их способность участвовать в снижении риска развития онкологических заболеваний человека. Масляная кислота, продуцируемая пробиотическими бактериями, является важным антиканцерогенным агентом [29]. Ген, кодирующий бутирил-СоА-дегидрогеназу (but), найден в исследуемых штаммах (см. табл. 3).

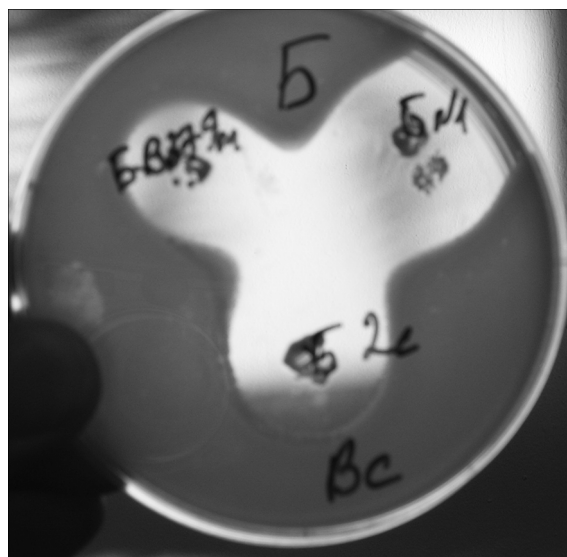


Рис. 1. Антагонистическая активность бифидобактерий (*B. longum* 201, *B. longum* 264, *B. bifidum* 172) по отношению к *B. subtilis* 534. Для других штаммов бифидобактерий результаты аналогичные.

Таблица 4

Антагонистическая активность бифидобактерий

Штаммы бифидобактерий	Штаммы патогенных и условно-патогенных микроорганизмов						
	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	<i>S. typhimurium</i> 415	<i>S. sonnei</i> I фазы 941	<i>B. subtilis</i> 534	<i>E. coli</i> BVK083	<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	<i>S. aureus</i> 25923
<i>B. bifidum</i> 172	0	22±1*	35±2*	35±2*	35±2*	35±2*	35±2*
<i>B. adolescentis</i> 191	0	35±2*	35±2*	35±2*	35±2*	35±2*	30±1*
<i>B. longum</i> 201	0	35±2*	30±1*	35±2*	30±1*	35±2*	35±2*
<i>B. angulatum</i> 212	0	35±2*	34±2*	35±2*	30±1*	35±2*	25±1*
<i>B. longum</i> 264	0	21±1*	25±1*	21±1*	21±1*	21±1*	28±1*

Примечание. * – зона отсутствия роста (в мм).

Микробиота человека неодинакова у людей разных континентов, стран, регионов. Как показал сравнительный анализ нуклеотидной последовательности полностью секвенированных геномов штаммов бифидобактерий *B. longum*, выделенных в различных странах, в том числе в России, несмотря на высокую степень гомологии, каждый геном содержит уникальные гены, не имеющие гомологов. Только в геномах российских штаммов выявлено 9 уникальных генов, из которых 5 генов обнаружены в штамме *B. longum* 264. Это гены, кодирующие: гликозилтрансферазу 1-й группы семейства протеинов, гликозилтрансферазу 2-й группы семейства протеинов, ацетилтрансферазу, аспарат-аммоний-лигазу, гидантоиназную субъединицу бета. Это свидетельствует о наличии региональной связи между отечественными штаммами и указывает на необходимость их использования для населения того региона, где они выделены.

Проведенные исследования позволили выявить в исследуемых штаммах *B. longum* 201 и *B. longum* 264 важные пробиотические гены, что позволяет рекомендовать их в качестве региональных, эффективных пробиотиков.

Все штаммы проявили высокую антагонистическую активность по отношению к *S. aureus* 25923, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. typhimurium* 415, *S. sonnei* I фазы 941, *B. subtilis* 534 (рис. 1), *E. coli* BVK O₈₃. Ни один из штаммов бифидобактерий не оказал влияния на *Candida albicans* 885–653 (табл. 4).

При исследовании пяти антагонистически активных штаммов бифидобактерий лецитиназной, казеинолитической, уреазной, желатиназной, нуклеазной, каталазной, гемолитической активности у данных бактерий не обнаружено

вышеупомянутой активности. Все штаммы не имеют указанных фенотипических признаков, ассоциированных с синтезом ферментов патогенности.

Средний показатель адгезии (СПА) бифидобактерий кишечника колебался от 1,24 до 2,12, в среднем составил 1,74±0,2. Пять штаммов бифидобактерий имели значение адгезивности (табл. 5), удовлетворяющее требованиям ОФС к штаммам микроорганизмов, используемых для производства пробиотических препаратов [15].

Все штаммы бифидобактерий проявили чувствительность к цефуроксиму, цефаклору, ципрофлоксацину, ванкомицину, фузидину, цефалотину, цефазолину, цефалексину, рокситромицину, клиндамицину, линезолиду, меропенему, 4 штамма – к оксациллину, эритромицину, линкомицину, рифампицину, бензилпенициллину и амикацину, 3 штамма – к гентамицину (рис. 2).

Закключение. Сформирована коллекция из 87 штаммов бифидобактерий, характерных для жителей ЦФО России. Отобраны 5 штаммов бифидобактерий: *B. longum* 201, *B. longum* 264, *B. bifidum* 172, *B. adolescentis* 191, *B. angulatum* 212. Проведены их видотипирование и первичный анализ в соответствии с требованиями ОФС по пробиотическим свойствам. Штаммы обладают высокой антагонистической активностью к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. По чувствительности к антибиотикам, адгезивным свойствам, безопасности, непатогенности они соответствуют основным требованиям ОФС к штаммам микроорганизмов, используемых для производства пробиотиков для медицинского применения. Отобранные штаммы несут широкий спектр полезных пробиотических признаков. Они могут быть рекомендованы в качестве основы для создания препаратов. Планируется провести исследование иммуномодулирующих свойств штаммов в соответствии с международными требованиями, изучить другие пробиотические характеристики и в зависимости от полученных результатов использовать данные штаммы для разработки на их основе фармабиотиков для лечения гастроэнтерологических, иммунологических, онкологических, нейродегенеративных и других заболеваний [30–34].

Таблица 5

Средний показатель адгезии штаммов бифидобактерий ($\bar{X} \pm m$)

Штаммы бифидобактерий	СПА ($M \pm m$)
<i>B. bifidum</i> 172	2,12±0,21
<i>B. adolescentis</i> 191	1,24±0,19
<i>B. longum</i> 201	2,08±0,16
<i>B. angulatum</i> 212	1,56±0,22
<i>B. longum</i> 264	1,68±0,24

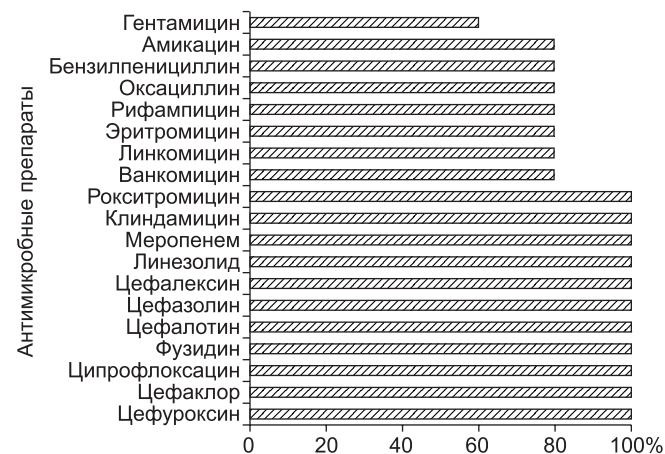


Рис. 2. Чувствительность бифидобактерий к антимикробным препаратам.

ЛИТЕРАТУРА

7. Червинец Ю.В., Беляева Е.А., Червинец В.М., Самоукина А.М., Михайлова Е.С., Пятова А.И., Червинец А.В. Нарушения микробиоты желудочно-кишечного тракта здоровых людей. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2013; 3: 55–8.
8. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Михайлова Е.С., Самоукина А.М., Беляева Е.А., Миронов А.Ю. Микробиоценоз кишечника и иммунный статус у детей младшего школьного возраста. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 1: 49–51.
9. Червинец Ю.В., Ботина С.Г., Глазова А.А., Коробан Н.В., Червинец В.М., Самоукина А.М., Гаврилова О.А., Лебедев Д.В., Миронов А.Ю. Генетическая паспортизация и изучение способности к формированию биопленок лактобациллами, выделенными из полости рта здоровых людей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 2: 44–6.
10. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю., Ботина С.Г., Гагарина Е.Ю., Самоукина А.М., Михайлова Е.С. Индигенные лактобациллы полости рта человека – кандидаты в пробиотические штаммы. *Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье»*. 2012; 1: 131–7.
13. 7 ОФС Пробиотики для медицинского применения. Общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи на иммунобиологические лекарственные средства и методы оценки их качества, Минздрав России, <http://www.rosminzdrav.ru/docs/mzsr/regulation/81>.
14. 8 ОФС Требования к штаммам микроорганизмов, используемые для производства пробиотиков и изучения способности к применению. Общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи на иммунобиологические лекарственные средства и методы оценки их качества, Минздрав России, <http://www.rosminzdrav.ru/docs/mzsr/regulation/81>.
15. 13 ОФС Бифидосодержащие пробиотики для медицинского применения. Общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи на иммунобиологические лекарственные средства и методы оценки их качества, Минздрав России, <http://www.rosminzdrav.ru/docs/mzsr/regulation/81>.
23. Червинец Ю.В., Бондаренко В.М., Шабанова Н.А., Самоукина А.М., Червинец В.М. Бактериоциногенные высокоантагонистические штаммы лактобацилл. *Журнал микробиологии*. 2006; 7: 78–82.

REFERENCES

1. Ventura M., O'Flaherty S., Claesson M. J., Turroni F., Klaenhammer T. R., van Sinderen D., O'Toole P. W. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probionomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 61–71.
2. Turroni F., Ribbera A., Foroni E., van Sinderen D., Ventura M. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *A van Leeuw J. Microb.* 2008; 94: 35–50.
3. Imaoka A. et al. Anti-inflammatory activity of probiotic Bifidobacterium: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14 (16): 2511–6.
4. Ewaschuk J.B. et al. Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008; 295: 1025–34.
5. Turroni F., van Sinderen D., Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium. *Int. J. Food Microbiol.* 2011; 149: 37–44.
6. Hidalgo-Cantabrana C., Lopez P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Margolles A., Ruas-Madiedo P. Immune Modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics & Antimicro Prot.* 2012; 4: 227–37.
7. Chervinets Yu.V., Belyaeva E.A., Chervinets V.M., Samoukina A.M., Mikhaylova E.S., Pyatova A.I., Chervinets A.V. Disturbances microbiota of the gastrointestinal tract of healthy humans. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2013; 3: 55–8. (in Russian)
8. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Mikhaylova E.S., Samoukina A.M., Belyaeva E.A., Mironov A.Yu. Microbiocenosis of intestine and immune status of children of primary school age. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 1: 49–51. (in Russian)
9. Chervinets Yu.V., Botina S.G., Glazova A.A., Koroban N.V., Chervinets V.M., Samoukina A.M., Gavrilo O.A., Lebedev D.V., Mironov A.Yu. Genetic study of certification and the ability to form biofilms lactobacilli isolated from the oral cavity of healthy humans. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2011; 2: 44–6. (in Russian)
10. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Mironov A.Yu., Botina S.G., Gaгарина Е.Ю., Samoukina A.M., Mikhaylova E.S. Indigenous human oral lactobacilli – candidate probiotic strains. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i zdorov'e"*. 2012; 1: 131–7. (in Russian)
11. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioessays*. 2011; 33: 574–81.
12. Quigley E. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011; 11: 593–603.
13. 7 GPA Probiotics for medical use. General pharmacopoeia articles and pharmacopoeia articles on immunobiological drugs and methods for evaluating their quality, Russian Ministry of Health, <http://www.rosminzdrav.ru/docs/mzsr/regulation/81>.
14. 8 GPA Requirements to the strains of microorganisms used in probiotics production for medical use. General pharmacopoeia articles and pharmacopoeia articles on immunobiological drugs and methods for evaluating their quality, Russian Ministry of Health, <http://www.rosminzdrav.ru/docs/mzsr/regulation/81>.
15. 13 GPA Bifidobacteria probiotics for medical use. General pharmacopoeia articles and pharmacopoeia articles on immunobiological drugs and methods for evaluating their quality, Russian Ministry of Health, <http://www.rosminzdrav.ru/docs/mzsr/regulation/81>.
16. Lee J.H., Karamychev V.N., Kozyavkin S.A. et al. Comparative genomic analysis of the gut bacterium Bifidobacterium longum reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics*. 2008; 27:247. doi:10.1186/1471-2164-9-247.
17. Averina O.V., Nezametdinova V.Z., Alekseeva M.G., Danilenko V.N. Genetic instability of probiotic characteristics in the Bifidobacterium longum subsp. longum B379M strain during cultivation and maintenance. *Russ. J. Genet.* 2012; 48: 1103–11. (in Russian)
18. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Paslier D.Le, Yamada T., Mende D.R. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473: 174–80.
19. Tyakht A.V., Kostryukova E.S., Popenko A.S., Belenikin M.S., Pavlenko A.V., Larin A.K. et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *NATURE COMMUNICATIONS*. 2013. DOI: 10.1038/ncomms3469 www.nature.com/nature-communications.
20. Yatsunenko T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486 (7402): 222–7. doi:10.1038/nature11053.
21. Vincent B. Young The intestinal microbiota in health and disease. *Curr. Opin Gastroenterol.* 2012; 28 (1): 63–9. doi:10.1097/MOG.0b013e32834d61e9.
22. Elaine Holmes, Jia V.Li, Thanos Athanasiou, Hutan Ashrafiyan, Jeremy K. Nicholson Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in Microbiology*. 2011; 19 (7): 349–59.
23. Chervinets Yu.V., Bondarenko V.M., Shabanova N.A., Samoukina A.M., Chervinets V.M. Bacteriocinogenic highly antagonistic strains of Lactobacilli. *Zhurnal mikrobiologii*. 2006; 7: 78–82. (in Russian)
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Seventh Edition. NCCLS document M2-A7 (ISBN 1-56238-393-0). NCCLS, Wayne, PA 19087-1898, 2000.
25. Pokusaeva K., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 2011; 6: 285–306.
26. Collado M.C., Gueimonde M., Herna'ndez M. Sanz., Salminen S. Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*. 2005; 12: 2502–720.
27. Fanning S., Hall L. J., Cronin M., Zomer A., Mac Sharry J., Goulding D. et al. Bifidobacterial surface exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2012; 109: 2108–13.
28. McIntyre A., Gibson, P. R., Young, G. P. Butyrate production from dietary fiber and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*. 1993; 34: 386–91.
29. Cani P.D., Delzenne N.M. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology & Therapeutics*. 2011; 130: 202–12.
30. Qin J., Li Y., Cai Z. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012; 490: 55–60.
31. Greiner T., Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends in endocrinology and metabolism*. 2011; 22 (4): 117–23.
32. Karlsson F.H., Fek F., Nookaew I., Tremaroli V., Fagerberg B., Petronovic D., Ba'Ekhed F., Nielsen J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications*. 2012; 3: 1245/ DOI: 10.1038/ncomms 2266.
33. Zhu Y., Luo T.M., Jobin C., Young H. A. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Letters*. 2011; 309: 119–27.

Получила 26.03.14

Received 26.03.14