

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

имени М.В. Ломоносова  
Биологический факультет

---

*на правах рукописи*

ПИКСАСОВА  
ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА

**НОВЫЙ ПОДХОД  
К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ  
БИФИДОБАКТЕРИЙ**

03.00.07 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2009 г.

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
профессор

Нетрусов Александр Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор

Даниленко Валерий Николаевич

кандидат медицинских наук

Мельников Вячеслав Геннадьевич

Ведущая организация:

Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов

имени Г.К.Скрябина РАН

Пушино, Московская область

Защита состоится 11 декабря 2009 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. 557.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан 10 ноября 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Н.Ф.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Бифидобактерии являются одними из наиболее широко известных и используемых в производстве пробиотиков. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека представляет собой комплексную экосистему, которая содержит представителей трех доменов живого: эукариоты, бактерии и археи. В норме в кишечнике преобладают бактериоиды, молочнокислая микрофлора (бифидобактерии и лактобактерии), анаэробные стрептококки, кишечная палочка, энтерококки и другие микроорганизмы. Концентрация микроорганизмов в толстом кишечнике человека достигает  $10^{11}$ - $10^{12}$  клеток на 1 г содержимого (Huys *et al.*, 2008). Самые многочисленные и представители полезной микрофлоры – это бифидобактерии. Вырабатывая молочную и уксусную кислоту, они препятствуют размножению патогенных микроорганизмов. Молочная кислота создает идеальную среду для работы кишечника. Бифидобактерии стимулируют перистальтику, предупреждая запоры и поносы, повышают иммунитет организма, разлагают некоторые канцерогены и вырабатывают витамины. Колонизация микробами ЖКТ человека начинается немедленно с появлением ребенка на свет и протекает под влиянием таких факторов, как питание ребенка (грудное или искусственное кормление), гигиенические условия. Одними из первых микробных колонизаторов, заселяющих кишечник ребенка, являются бифидобактерии. Однако в течение жизни численность бифидобактерии постепенно сокращается под воздействием процессов старения, стрессов и неправильного питания (Huys *et al.*, 2008).

Согласно современной систематике известно 29 видов бифидобактерий. Большинство из описанных к настоящему времени видов бифидобактерий были выделены из ЖКТ млекопитающих, насекомых и птиц. Некоторые виды бифидобактерий, как, например, *Bifidobacterium bifidum*, *B.breve* и *B.longum* subsp. *longum*, считается, относятся к видам истинно «человеческого» происхождения. Другие - *B.gallinarum*, *B.angulatum* и *B.cuniculi* – описаны как виды «животного» происхождения (Felis and Dellaglio, 2007). Некоторые виды чрезвычайно близки между собой, как например, *B.pullorum* и *B.gallinarum* (Yin *et al.*, 2005), другие были реклассифицированы до подвидов, как например, *B.longum* subsp. *infantis* (German *et al.*, 2008) или *B.animalis* subsp. *lactis* (Ventura *et al.*, 2004). Представители бифидобактерий обладают разными свойствами. Многие считают, что бифидобактерии хорошо растут и развиваются в йогуртах. На самом же деле только три вида, *B.bifidum*, *B.longum* subsp. *infantis* и *B.animalis*, обладают доказанной способностью расти в молочной среде (Храмцов и др., 2003).

Бифидобактерии используются как добавка к пищевым продуктам в качестве важного компонента «функционального питания». Пробиотическое действие бифидобактерий включает в себя снижение риска возникновения инфекционных заболеваний (в том числе, бактериальной

и вирусной диареи), облегчение течения хронических воспалительных заболеваний (в том числе, паучита и язвенного колита), улучшение различных аспектов физиологического состояния (в том числе, снижение уровня холестерина в крови и коррекция непереносимости лактозы) и, наконец, снижение вероятности развития зубного кариеса, аллергии, астмы и даже рака. Благодаря столь важному и разнообразному спектру лечебно-профилактического действия бифидобактерий, на выделение из естественных природных источников и анализ новых штаммов отпущены значительные ресурсы, как со стороны коммерческих, так и научных организаций. Важно не только понять и изучить пробиотическое действие бифидобактерий, но также и накопить библиотеку штаммов, которые бы обладали этими свойствами. Поэтому работы по выделению и накоплению штаммов, обладающих пробиотическим потенциалом, важны и требуют приложения надёжных и быстрых методов их обнаружения и идентификации. Идентификация любого штамма всегда начинается с описания его физиолого-биохимических характеристик. Однако не всегда среди этих признаков есть такой, который позволит с уверенностью определить систематическое положение культуры хотя бы на уровне рода. Широко известен полиморфизм бифидобактерий. Далеко не так много штаммов демонстрируют образование клеток классической вилочковидной «бифидо»-формы, как это принято считать. Они часто похожи на прямые палочки, коккобациллы, образуют скопления и даже цепочки клеток. Невысокая скорость роста и неустойчивость ко многим факторам стресса, среди которых низкая кислотность среды и контакт с кислородом воздуха, затрудняет культивирование бифидобактерий в лабораторных условиях и выделение их в чистую культуру. Поэтому необходим метод анализа, позволяющий установить наличие или отсутствие бифидобактерий в образце. Высококчувствительные молекулярные методы, такие как, например, ПЦР, позволяют определять бифидобактерии в образце исходного субстрата, в накопительной и, конечно, в чистой культуре. В последние годы активно развивается область молекулярных методов в идентификации микроорганизмов. Большинство методов молекулярного анализа, как показывает опыт, пока основывается на гене малой субъединицы рибосомальной РНК бактерий, 16S рРНК, но не всегда этого оказывается достаточно. Различные исследования предлагают новые альтернативные генетические мишени для идентификации бифидобактерий, такие как гены *atpD* (Ventura *et al.*, 2004), *tuf* (Ventura and Zink, 2003), *recA* (Kullen *et al.*, 1997; Ventura and Zink, 2003), *groEL* (Jian *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2006), *dnaJ* (Ventura *et al.*, 2006), *purF* (Ventura *et al.*, 2006), *rpoC* (Ventura *et al.*, 2006), *dnaB* (Ventura *et al.*, 2006), *xfp* (Ventura *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2005) и *clpC* (Ventura *et al.*, 2005; Ventura *et al.*, 2006) или межгенные области, используемые для видовой идентификации или мониторинга штаммов бифидобактерий, выделяемых из различных природных источников. Совокупность различных тестов, а также использование нескольких генетических мишеней, позволяет получить

достоверную информацию о систематическом положении штамма, и даже о его эволюционном пути внутри группы подобных культур. Однако мультипараметрические исследования всегда лимитированы стоимостью проведения анализов. Таким образом, разработка, с одной стороны, простого, а с другой – быстрого, достоверного и недорогого метода идентификации штаммов является одним из приоритетных направлений прикладной микробиологии.

**Цель исследования:** разработка нового подхода к обнаружению и идентификации штаммов бифидобактерий на уровне рода и вида с использованием в качестве молекулярной мишени гена фруктозо-6-фосфат-фосфокетолазы бифидобактерий, являющимся уникальным ферментом для данной группы микроорганизмов.

В соответствии с этой целью были сформулированы следующие **задачи:**

1. На основе полимеразной цепной реакции с парой праймеров в области гена *xfp* разработать родоспецифический тест к *Bifidobacterium* spp.
2. Определить специфичность данного теста в отношении бифидобактерий и показать отсутствие ложных положительных результатов с ДНК бактерий других родов.
3. Разработать метод видовой идентификации бифидобактерий на основе рестрикционного анализа фрагментов амплификации гена *xfp*.
4. Оценить степень вариабельности амплифицируемого участка гена *xfp*, с точки зрения его потенциального использования в качестве генетической мишени для идентификации изолятов бифидобактерий на основании сравнения последовательности данного участка.
5. Подобрать технологию длительного хранения штаммов бифидобактерий с сохранением жизнеспособности культуры.

**Научная новизна:** выделены новые штаммы бифидобактерий, относящиеся к видам *B.bifidum*, *B.longum*, *B.animalis* subsp. *lactis*, *B.adolescentis*, *B.pullorum*, *B.pseudolongum* из фекалий животных. Идентификацию изолятов на уровне рода проводили с использованием ПЦР-анализа гена *xfp*, кодирующего Фр-6-Ф-фосфокетолазу бифидобактерий. Впервые использован метод рестрикционного анализа фрагментов амплификации в приложении к гену *xfp* с целью видовой идентификации штаммов. Впервые идентификацию штаммов бифидобактерий проводили на основе сравнения последовательности вновь выделенных штаммов с типовыми на участке с 576 по 1279 нуклеотид гена *xfp*. Проведена оценка достоверности данного вида анализа для идентификации изолятов.

В ходе выполнения экспериментальных исследований получены новые данные об особенностях лабораторного культивирования бифидобактерий. Проведен анализ и

модификация состава накопительных и селективных питательных сред. Определен спектр природных источников бифидобактерий с целью выделения наиболее стабильных штаммов. Проведен анализ нескольких вариантов родоспецифической ПЦР с праймерами, опубликованными в литературе. Доказана специфичность и высокая чувствительность новой ПЦР на ген *xfp*. Разработан метод видовой идентификации бифидобактерий с использованием двух эндонуклеаз рестрикции, *Ama87I* и *Vsp19I*, в приложении к амплифицируемому участку гена *xfp* в данной ПЦР с родоспецифическими праймерами.

**Практическая значимость:** разработанные при выполнении диссертационного исследования методические подходы могут быть использованы для анализа как накопительных, так и чистых культур, содержащих бифидобактерии. В случае чистой культуры или смеси двух или более культур, одна из которых относится к роду *Bifidobacterium*, возможно использование продукта родоспецифической ПЦР для рестрикционного анализа и/или непосредственного нуклеотидного секвенирования с целью точной идентификации штамма. Полученные данные могут найти применение при чтении курсов по промышленной микробиологии, биотехнологии и экологии микроорганизмов, а использованные в данной работе методы анализа, такие как, например, тест на определение активности Фр-6-Ф-фосфокетолазы бифидобактерий может быть включен в курс практических занятий для студентов-микробиологов ВУЗов.

**Апробация работы:** основные результаты работы были доложены и обсуждены на международной конференции по пробиотикам «Enteric Bacteria and Inflammatory Bowel Disease» (Цахкадзор, Республика Армения, 2008), международной конференции по пробиотикам «EUPROBIO 2008» (Краков, Польша, 2008) и на 3-м международном конгрессе ФЕМО (Гётеборг, Швеция, 2009).

**Публикации:** по материалам диссертации опубликовано 8 научных работ (3 статьи, из них 1 в рецензируемом журнале, из рекомендованных ВАК, тезисы докладов на 5 конференциях).

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 155 страницах, содержит 22 таблицы и 11 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (129 литературных источников, из которых 10 отечественных и 119 иностранных).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Было проанализировано 115 образцов, 108 из которых были представлены культурами бифидобактерий и еще 7 были предоставлены нам в виде образцов тотальной ДНК бифидобактерий из лаборатории микробиологии факультета фармацевтических наук и биологии Университета Париж Декарт (Париж, Франция) для анализа молекулярными методами. Из 108 культур бифидобактерий 32 были выделены из фекалий животных на кафедре микробиологии МГУ, 3 штамма были выделены из фекалий домашнего скота и предоставлены нам Институтом инженерной иммунологии (Любучаны, Россия), еще 59 штаммов были выделены из фекалий взрослых людей и предоставлены нам Государственным научным центром Институтом медико-биологических проблем РАН (Москва, Россия). В качестве контрольной группы были взяты 12 типовых штаммов и 2 штамма бифидобактерий, разрешенных к промышленному использованию на территории Российской Федерации, которые были приобретены нами в аптеке в виде препаратов пробиотического назначения и служили сравнительными в данной работе. В дальнейшем данные 14 образцов именовались референсными или типовыми (только для типовых штаммов). Типовые штаммы включали представителей следующих видов – *B.adolescentis*, *B.animalis* subsp. *animalis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.animalis* subsp. *lactis*, *B.longum*, и были предоставлены из коллекции КМ МГУ.

Специфичность работы праймеров исследовали с использованием ДНК 58 культур бактерий из коллекции КМ МГУ, не относящихся к роду *Bifidobacterium*. Среди последних присутствовали представители следующих родов и видов – 16 видов рода *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis*, *Sporolactobacillus* spp., *Bacteroides galacturonicus*, *Leuconostoc mesenteroides*., *Bacillus* spp., *E.coli*, *Gardnerella vaginalis*.

При подборе оптимального состава питательной среды для культивирования бифидобактерий использовали большое количество сред, как коммерческого состава, так и подобранных нами. В качестве коммерческих сред использовали следующие: среда Вилкинса-Чальгрена для бифидобактерий (WCB broth, Oxoid), среда TOS (Yakult Pharmaceutical, Япония), «Бифидум-среда» (Государственный научный центр прикладной микробиологии, Оболенск).

Проверку селективности ципрофлоксацина и мупироцина в отношении микроорганизмов, не относящихся к группе бифидобактерий, проводили с добавлением антибиотика в «бифидум-среду» до конечной концентрации 50 и 100 мкг/мл.

Лиофилизацию культур бифидобактерий производили с использованием оборудования для лиофильного высушивания Labconco (США) при глубине вакуума в 4,9 Па, температуре конденсора минус 25°C.

Тест на Фр-6-Ф-фосфокетотазу проводили согласно предложенному методу (Scardovi, 1986). Перед разрушением ультразвуком клетки обрабатывали лизоцимом.

Ацетат измеряли с помощью газожидкостной хроматографии на приборе Crystal 2000M (ЗАО СКБ "Хроматэк", г. Йошкар-Ола), оснащённым микрокапиллярной колонкой FFIP (15000 × 0,5 мм), газ носитель – аргон, расход 15 мл/мин, детектор – ПИД, температура детектора – 200°C, температурный градиент в термостате от 70 до 160°C. Анализы проводили на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ. Результаты хроматографии были обработаны программным обеспечением Chromatec Analytic 2.5 (ЗАО СКБ "Хроматэк", г. Йошкар-Ола). Концентрацию лактата измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Образцы вносили в проточную электрохимическую ячейку (wall-jet ячейка) с лактатным биосенсором. Биосенсоры для определения лактата и проточная ячейка были любезно предоставлены компанией ООО "РУСЕНС" (Россия, Москва).

Препараты тотальной ДНК получали с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-АМ», согласно рекомендованной производителем методике.

ПЦР с целью специфического определения бифидобактерий на уровне рода проводили с использованием праймеров, специально подобранных к гену малой субъединицы 16S рибосомальной РНК и гену *xfp* бифидобактерий, представленные в таблице 1. Праймеры были синтезированы в компании Синтол (Москва, Россия) и в компании Eurogenetic S.A. (Бельгия).

**Таблица 1. Родоспецифические олигонуклеотидные праймеры для идентификации *Bifidobacterium* spp. при помощи ПЦР.**

Мишень	Ген	Название	Последовательность (5'-3')	Длина праймера (п.о.)	ПЦР-продукт (п.о.)	Ссылка
<i>Bifidobacterium</i> spp.	ген16S рРНК	<b>Lm26f</b>	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	21	1343	Kaufmann <i>et al.</i> , 1997
		<b>Lm3r</b>	CGGGTGCTTCCCACCTTTCATG	21		
<i>Bifidobacterium</i> spp.	ген16S рРНК	<b>g-Bifid-F</b>	CTCCTGGAAACGGGTGG	17	557	Matsuki <i>et al.</i> , 2002
		<b>g-Bifid-R</b>	GGTGTCTTCCCGATATCTACA	22		



<i>Bifidobacterium</i> spp.	ген16S	<b>Bif164</b>	GGGTGGTAATGCCGGATG	18	523	Kok et al., 1996
	рРНК	<b>Bif662</b>	CCACCGTTACACCGGGAA	18		
<i>Bifidobacterium</i> spp.	ген <i>xfp</i>	<b><i>xfp-F</i></b>	CGGCTGGCAGTCCAACAA	18	704	Данная работа
		<b><i>xfp-R</i></b>	GGTTGTTCTTGATGATGTCGC	21		

С целью специфического определения бифидобактерий на уровне вида проводили анализ с использованием мультиплексной ПЦР, позволяющей определять несколько видов бифидобактерий в одной пробирке. Использованные в данном тесте олигонуклеотидные праймеры, подобранные к гену малой субъединицы рибосомальной РНК, представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Видоспецифические олигонуклеотидные праймеры для идентификации *Bifidobacterium* spp. при помощи мультиплексной ПЦР.**

Мишень	Ген	Название	Последовательность (5'-3')	Длина праймера (п.о.)	ПЦР-продукт (п.о.)	Лит. источник
<b>ПЦР-1</b>						
<i>B. bifidum</i>	ген16S	BiBIF-F	CCACATGATCGCATGTGATTG	21	278	Matsuki et al., 1998
	рРНК	BiBIF-R	CCGAAGGCTTGCTCCCAA	19		
<i>B. breve</i>	ген16S	BiBRE-F	GGGAGCAAGGCACTTTGTGT	20	568	Matsuki et al., 1998
	рРНК	BreInf-R	GAAACCCCATCTCTGGGATC	20		
<i>B. infantis</i>	ген16S	BiINF-F	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	826	Mullie et al., 2003
	рРНК	BreInf-R	GAAACCCCATCTCTGGGATC	20		
<b>ПЦР-2</b>						
<i>B. adolescentis</i>	ген16S	BiADO-F	CTCCAGTTGGATGCATGTC	19	278	Matsuki et al., 1999
	рРНК	BiADO-R	CGAAGGCTTGCTCCCAGT	18		
<i>B. longum</i>	ген16S	BiLON-F	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	831	Matsuki et al., 1999
	рРНК	BiLON-R	GGGAAGCCGTATCTCTACGA	20		

Для температурного циклирования использовался ДНК амплификатор GeneAmp 9700 (Applied BioSystems, США).

Анализ длин фрагментов рестрикции амплифицированного участка геномой ДНК осуществляли с использованием двух различных эндонуклеаз рестрикции *Ama87I* (аналогичной *AvaI* и *Eco88I*, сайт узнавания – C↓YCGRG) и *Bsp19I* (аналогичной of *NcoI*,

сайт узнавания – C↓CATGG, СибЭнзим, Россия) в конечной концентрации 1-2 единицы на реакцию, общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл. В качестве матрицы действия ферментов рестрикции использовали ПЦР продукт – амплифицированный участок гена *xfp* бифидобактерий длиной 704 п.о., полученный в результате проведения ПЦР с праймерами *xfp*-F и *xfp*-R.

Секвенирование проводили с использованием набора реактивов и согласно инструкции к прибору, 4-капиллярному генетическому анализатору ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

Сравнительный анализ и поиск гомологичных последовательностей проводили по базе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Анализ результатов секвенирования, построение нуклеотидных выравниваний и расчёт генетических дистанций между сравниваемыми штаммами осуществляли с помощью компьютерных программ AlignX и VectorNTI v10.3.0 (Invitrogen Corporation, США); ABI 2 FASTA Converter v1.0.0.14 beta (HeracleSoftware, Германия); ChromasPro v1.5 (Technelysium Pty Ltd, Австрия); программного обеспечения генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Множественные выравнивания последовательностей проводили, используя программы, доступные в Интернете: ClustalX ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)) и Mega2 v4.0.2 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)). Для построения филогенетического дерева использовали метод Neighbour-Joining (NJ) и модель – Nucleotide: p-distance.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1 Выделение штаммов бифидобактерий и анализ устойчивого их роста

#### 1.1. Подбор состава накопительных и селективных питательных сред

В процессе работы были рассмотрены различные варианты наиболее широко используемых сред для культивирования бифидобактерий, проведен анализ основных компонентов и попытка подбора универсального состава основной питательной среды с учетом поставленных задач, а именно выделением диких штаммов бифидобактерий из природных источников, эффективного поддержания их жизнеспособности и накопления биомассы для лиофильного высушивания культур, с целью дальнейшего использования и внесения в коллекцию кафедры микробиологии биологического факультета МГУ.

Был проведен анализ состава коммерческих питательных сред, а также состава сред, рекомендуемых для культивирования бифидобактерий в опубликованных научных статьях. Рост бифидобактерий анализировали на 8 вариантах накопительных питательных сред различного состава. В результате было показано, что наибольшей стабильностью обладали культуры при выращивании их на среде, получившей рабочее название «обогащенной бифидум-среды», которая была создана нами на основе «Бифидум-среды»

производства Государственного научного центра прикладной микробиологии (Оболensk) следующего состава (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки – 8,0; пептон ферментативный – 8,0; NaCl – 4,0. Состав обогащенной бифидум-среды следующий (г/л): сухая смесь «Бифидум-среды» (Оболensk) – 30,0; панкреатический гидролизат рыбной муки – 50,0; твин-80 – 1 мл; гемин – 25 мл исходного раствора (конечная концентрация гемина в среде составляет 5 мкг/мл); 50%-ный раствор лактулозы – 2,5 мл; агар – 2%. Исходный раствор гемина содержит 200 мкг чистого вещества на 1 мл раствора. Готовую среду стерилизовали в автоклаве при 0,5 ати 20-30 минут. Раствор гемина рекомендуют вносить после стерилизации.

Как известно по данным предыдущих исследований, к естественными местообитаниям бифидобактерий относятся: человек (желудочно-кишечный тракт, влагалище, каринальные полости), ЖКТ млекопитающих животных, кишечник медоносных пчел, кисломолочные пищевые продукты и сточные воды. Однако два последних источника правильнее считать вторичными. Таким образом, в качестве источников выделения новых штаммов бифидобактерий мы использовали фекалии диких и домашних животных и самоквасные кисломолочные продукты различного географического происхождения. Всего было собрано образцов фекалий от 59 домашних и диких птиц. В результате данной работы коллекция КМ МГУ пополнилась 32 штаммами бифидобактерий, которые были выделены из одного кабана, 15 коз, двух свиней, четырех куриц, трех коров, одного кролика, одной крысы. Штаммы, помещенные в коллекцию КМ МГУ, обладали наиболее высокими показателями стабильного роста и выживаемости. Было протестировано 50 образцов кисломолочных продуктов, а также проба сычуга, используемая для производства сыра. Ни одного изолята бифидобактерий из данных источников выделено не было. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что фекалии коз являются наиболее перспективным природным источником устойчивых к культивированию форм бифидобактерий.

При выращивании смешанных культур на среде с ципрофлоксацином не происходило подавление лактобацилл, которые со временем полностью преобладали над бифидобактериями, не давая им развиваться.

При выращивании разведений накопительных культур на среде с добавлением мупироцина отмечался следующий эффект: наиболее крупные колонии при микроскопировании оказались представителями бифидобактерий, что далее было доказано при помощи методов молекулярного анализа. Не происходило полного ингибирования роста кокковых форм или лактобацилл на чашках с мупироцином, однако образуемые ими колонии были по размеру значительно меньше тех, которые

формировали бифидобактерии, что значительно облегчало процесс выделения последних в чистую культуру.

При использовании различных по составу питательных сред для культивирования бифидобактерий, не наблюдали зависимости формы клеток или их полиморфизма в зависимости от состава среды культивирования или отдельных компонентов среды. Однако для некоторых штаммов отмечали формирование более ветвящихся форм при старении культуры. Под старением культуры в данном случае понимается более длительное культивирование штаммов – 4-6 дней. Однако, данный эффект имел место только для представителей тех видов бифидобактерий, для которых характерно образование ветвящихся клеток и клеток с вздутиями и выпуклостями. А именно, мы наблюдали данные различия в форме клеток для следующих штаммов: *B.longum* М.379.В, *B.bifidum* и13, *B.bifidum* и14, штамм иб6, штамм и49, *B.pullorum/gallinarum* МГУ 391, *B.animalis* subsp. *lactis* МГУ 398.

Культуры бифидобактерий сохранялись в лиофильно высушенном состоянии. Мы показали, что при лиофилизации в обогащенной бифидум-среде без добавления криопротекторных веществ бифидобактерии хорошо переносят высушивание и не показывают снижения активности роста по сравнению с лиофилизацией в присутствии глицерола в качестве криопротектора.

## 1.2. Проверка аэротолерантности штаммов бифидобактерий

Устойчивость бифидобактерий к кислороду воздуха исследована для 14 штаммов коллекции КМ МГУ, которые показывали устойчивый рост при пассировании на плотных питательных средах. Для сравнения использовали типовые штаммы бифидобактерий - *B.lactis* DSM 10140<sup>T</sup>; *B.bifidum* ATCC 29521<sup>T</sup>; *B.breve* NCFB 2257<sup>T</sup>. Опытную культуру каждого штамма выдерживали в аэробных условиях, контрольную – только в анаэробных условиях.

Штаммы, вошедшие в экспериментальное определение устойчивости бифидобактерий к кислороду, были довольно стабильны при пересевах на плотной питательной среде, равно как и на жидкой. Таким образом, мы ожидали увидеть у них ту самую невосприимчивость к недолгим контактам с кислородсодержащей средой. Однако, не все из них показали такое свойство. А именно, из четырнадцати исследованных штаммов, только 7 росли на плотной среде после похождения испытания их кислородом. Снижение общей численности КОЕ составило 1-2 порядка. Наибольшую устойчивость показали штаммы *B.bifidum* К5В МГУ и *B.longum* К7В МГУ, выделенные нами из фекалий домашних коз. Можно говорить об их микроаэрофильности. Наиболее стабильным оказался штамм *B.animalis* subsp. *lactis* 398 МГУ, показавший практически

идентичное количество –  $6,2 \times 10^5$  и  $6,9 \times 10^5$  – жизнеспособных клеток на 1 мл опытной и контрольной культур.

Таким образом, мы подтвердили предположение о низкой степени устойчивости штаммов бифидобактерий к кислороду воздуха. Данный признак довольно просто проверить без необходимости привлечения сложного и дорогостоящего оборудования, однако он может служить одним из первых критериев при отборе промышленно ценных штаммов.

### 1.3. Тест на фруктозо-6-фосфат-фосфокетолазу и определение продуктов метаболизма бифидобактерий.

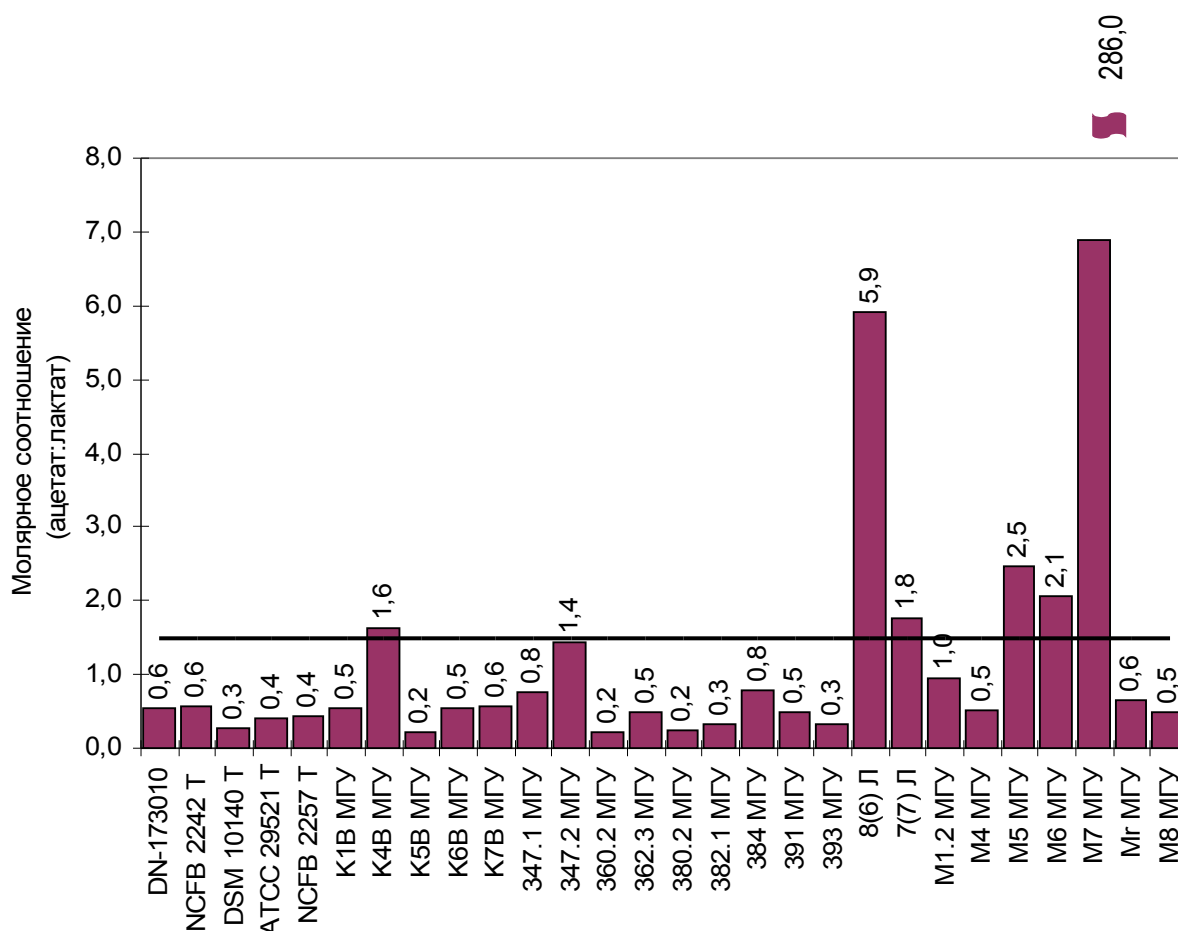
Концентрацию основных продуктов метаболизма бифидобактерий – ацетата и лактата, измеренную в молях на литр, использовали для расчета молярного соотношения этих продуктов в результате жизнедеятельности микроорганизма.

Принято считать, что бифидобактерии образуют уксусную и молочную кислоты в молярном соотношении 3:2. Было предложено использовать данное свойство бифидобактерий в качестве признака при идентификации штаммов. Однако по данным некоторых исследователей это соотношение соблюдается не всегда. Согласно полученным нами данным, соотношение продуктов метаболизма бифидобактерий действительно далеко от теоретического значения, как представлено в таблице 3 и на рисунке 1.

**Таблица 3. Определение молярного соотношения продуктов метаболизма бифидобактерий.**

Вид	Штамм	Концентрация лактата, моль/л	Концентрация ацетата, моль/л	Молярное соотношение ацетат:лактат
<i>B. animalis</i>	DN-173010	0,065284779	0,036114	<b>0,6</b>
<i>B. animalis</i>	NCFB 2242 <sup>T</sup>	0,046100609	0,026002	<b>0,6</b>
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	DSM 10140 <sup>T</sup>	0,079488317	0,022321	<b>0,3</b>
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521 <sup>T</sup>	0,05771547	0,023621	<b>0,4</b>
<i>B. breve</i>	NCFB 2257 <sup>T</sup>	0,042371762	0,018326	<b>0,4</b>
<i>B. bifidum</i>	K1B МГУ	0,045255418	0,024737	<b>0,5</b>
<i>B. bifidum</i>	K4B МГУ	0,017555113	0,028479	<b>1,6</b>
<i>B. bifidum</i>	K5B МГУ	0,045273144	0,009673	<b>0,2</b>
<i>B. bifidum</i>	K6B МГУ	0,053149227	0,028767	<b>0,5</b>
<i>B. longum</i>	K7B МГУ	0,017719709	0,009944	<b>0,6</b>
<i>B. pseudolongum</i>	347.1 МГУ	0,029809753	0,02277	<b>0,8</b>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	347.2 МГУ	0,008876781	0,012682	<b>1,4</b>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	360.2 МГУ	0,043961646	0,009365	<b>0,2</b>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	362.3 МГУ	0,032137821	0,015921	<b>0,5</b>
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	380.2 МГУ	0,025292107	0,006305	<b>0,2</b>
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	382.1 МГУ	0,027857624	0,00923	<b>0,3</b>
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	384 МГУ	0,032747134	0,025459	<b>0,8</b>
<i>B. pullorum/gallinarum</i>	391 МГУ	0,024098278	0,01187	<b>0,5</b>
<i>B. pseudolongum</i>	393 МГУ	0,032592319	0,010397	<b>0,3</b>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	8(6) Л	0,00250094	0,014771	<b>5,9</b>

<i>Bifidobacterium</i> sp.	7(7) Л	0,012504702	0,022134	<b>1,8</b>
<i>B.longum</i>	M1.2 МГУ	0,024613303	0,02365	<b>1,0</b>
<i>B.pullorum/gallinarum</i>	M4 МГУ	0,04411581	0,022275	<b>0,5</b>
<i>B.pullorum/gallinarum</i>	M5 МГУ	0,004085831	0,010033	<b>2,5</b>
<i>B.bifidum</i>	M6 МГУ	0,005254718	0,010783	<b>2,1</b>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	M7 МГУ	6,88678E-05	0,019693	<b>286,0</b>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Mr МГУ	0,036893663	0,023621	<b>0,6</b>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	M8 МГУ	0,050556619	0,024021	<b>0,5</b>



**Рисунок 1. Молярное соотношение продуктов метаболизма бифидобактерий.**

Из исследованных нами 28 штаммов бифидобактерий только три образуют ацетат и лактат в соотношении, близком к 1,5. Это штаммы *B.bifidum* K4B МГУ, *Bifidobacterium* sp. 347.2 МГУ и *Bifidobacterium* sp. 7(7) Л, молярное соотношение продуктов для которых составило 1,6, 1,4 и 1,8, соответственно. Для 21 штамма данное соотношение составило значение от 0,2 до 1,0, то есть они преимущественно образуют лактат, что является хорошим признаком для использования их в пищевом производстве. Два штамма - *B.pullorum/gallinarum* M5 МГУ и *B.bifidum* M6 МГУ, образуют в 2,5 и 2,1 раза больше ацетата, чем лактата. Штамм *Bifidobacterium* sp. 8(6) Л образовывал в 5,9 раз больше ацетата, чем лактата. Один штамм, *Bifidobacterium* sp. M7 МГУ, показал образование следовых количеств лактата, поэтому значение отношения ацетат:лактат составило в его случае чрезвычайно высокое значение – 286. Таким образом, мы видим широкую

вариабельность метаболизма бифидобактерий, что с одной стороны, подтверждает заявления тех исследователей, которые обращают внимание на несоблюдение этого теоретического равновесия, а с другой, свидетельствует о невозможности использования данного критерия в качестве диагностического при определении бифидобактерий.

## **2 Создание родоспецифического ПЦР теста, анализ его чувствительности и специфичности.**

### **2.1. Проверка пар праймеров из литературных источников.**

На основании данных других исследований были выбраны праймеры в области гена 16S рРНК для проведения родоспецифической ПЦР бифидобактерий (Kok et al., 1996; Kaufmann et al., 1997; Matsuki et al., 2002). Праймеры тестировали на 44 образцах тотальной бактериальной ДНК, 22 из которых принадлежали бифидобактериям видов *B.adolescentis*, *B.angulatum*, *B.animalis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.longum*, 15 – лактобациллам видов *Lactobacillus kefir*, *L.acidophilus*, *L.brevis*, *L.casei*, *L.caucasicus*, *L.delbrueckii*, *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L.fermentum*, *L.lindneri*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.pentosus*, *L.rhamnosus*, а также представителям родов *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Sporolactobacillus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Gardnerella*. Результаты анализа оказались неудовлетворительными с парами праймеров Lm26f и Lm3r, g-Bifid-F и g-Bifid-R. Пара Lm26f и Lm3r показала наличие ложноотрицательных результатов с 8 из 22 протестированных образцов ДНК бифидобактерий, ложноположительных результатов получено не было. Пара g-Bifid-F и g-Bifid-R показала наличие ложноотрицательных результатов с 3 из 22 протестированных образцов ДНК бифидобактерий, ложноположительные результаты были получены с двумя образцами ДНК лактобацилл, а именно *L.kefir* и *L.acidophilus*. Пара праймеров Bif662 и Bif164 не показала ложных результатов, и была использована в дальнейшей работе как референтные для проверки качества результатов родоспецифического определения бифидобактерий в ПЦР с праймерами на ген *xfp* (см. рисунок 2).

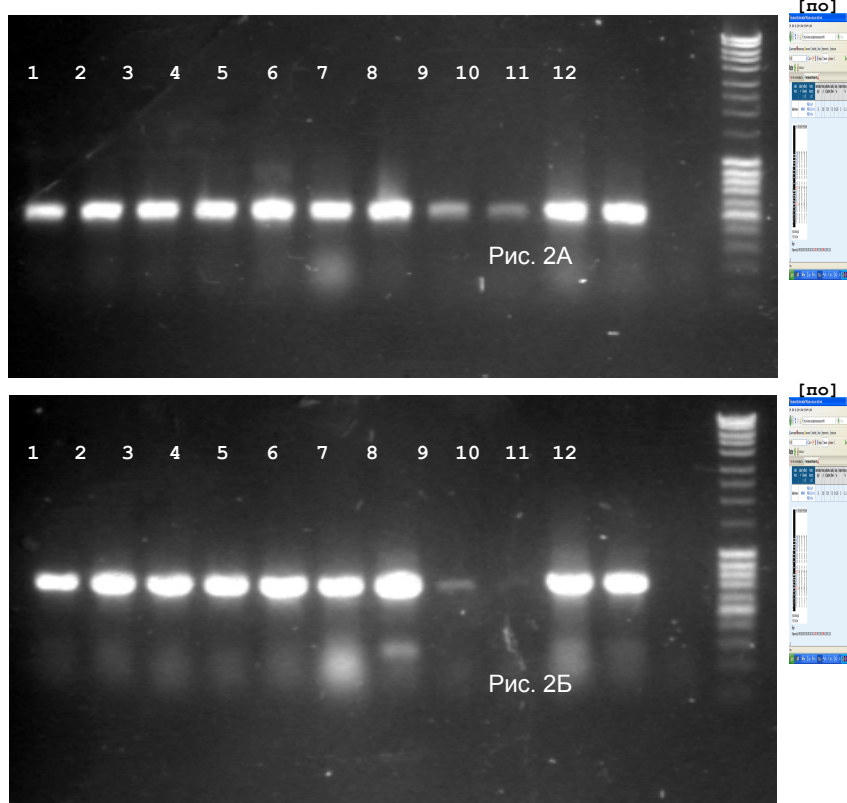


Рисунок 2. Результаты родоспецифической ПЦР некоторых штаммов бифидобактерий, полученные с парой праймеров Bif164-PCR и Bif662-PCR (Kok et al., 1996) в области гена *16S* рРНК (рис. 2А) и парой праймеров *xfp-F* и *xfp-R* в области гена *xfp* (Рис.2Б). Дорожка 1, *B.adolescentis* ATCC 15703<sup>T</sup>; дорожка 2, *B.animalis* subsp. *animalis* NCFB 2242<sup>T</sup>; дорожка 3, *B.bifidum* ATCC 29521<sup>T</sup>; дорожка 4, *B.breve* NCFB 2257<sup>T</sup>; дорожка 5, *B.infantis* ATCC 15697<sup>T</sup>; дорожка 6, *B.longum* ATCC 15707<sup>T</sup>; дорожка 7, *B.animalis* subsp. *lactis* DSM 10140<sup>T</sup>; дорожка 7, *B.longum* subsp. *infantis* и1; дорожка 8, *B.adolescentis* и7.1; дорожка 9, *B.longum* и16; дорожка 10, *B.longum* K5B МГУ; Дорожка 11, *B.longum* K7B МГУ; дорожка 12, *Lactobacillus acidophilus* NK-1 – отрицательный контроль; дорожка 13, MassRuler™ DNA Ladder Mix #SM0403 (Fermentas, Литва).

## 2.2. Подбор праймеров в области гена фруктозо-6-фосфат-фосфокетолазы бифидобактерий.

Столь ненадежные результаты идентификации бифидобактерий при помощи ПЦР в области гена *16S* рРНК привели нас к идее разработки более достоверного родоспецифического теста на основе полимеразной цепной реакции. Использование уникального гена для исследуемой группы бактерий служит дополнительной гарантией отсутствия перекрестных реакций с ДНК представителей других родов микроорганизмов. Наличие специфического метаболического пути бифидобактерий – это потенциальная возможность обнаружения такой уникальной генетической мишени. Выбор мишени был остановлен на *xfp* гене, кодирующем двусубстратный фермент – фруктозо-6-фосфат-фосфокетолазу бифидобактерий, так как по данным предыдущих исследований разных



авторов, данный белок обладает ферментативными свойствами, отличающими его от аналогичных фосфокетолаз других бактерий. Сравнительный анализ последовательности *xfp* гена представителей разных видов бифидобактерий показал наличие в нем большого количества консервативных областей (по литературным данным достигающих 73% длины всего гена, Yin et al., 2005), что свидетельствовало в пользу возможности использования гена *xfp* в качестве универсальной мишени для создания диагностических тестов для детекции и идентификации бифидобактерий на уровне рода. Сравнение последовательности *xfp* гена бифидобактерий с генами, кодирующими фосфокетолазы бактерий других родов показал их явное несоответствие друг другу, а следовательно подтверждал идею об уникальности данной последовательности в отношении группы бифидобактерий.

Праймеры подбирали в консервативных областях гена, расположенных в районе 576-594 и 1259-1280 нуклеотидов, считая с 5'-конца гена. Длина амплификата составляет 704 п.о. Уровень вариабельности амплифицируемой области по нашим оценкам находится в пределах 25-35%. Основное количество замен локализовано в области 150 нуклеотидов с 3'-конца амплифицируемой области. Вставок или делеций в данной области, превышающих 1-2 нуклеотида обнаружено не было, что должно было привести к отсутствию различий в длинах получаемых продуктов ПЦР гена *xfp*.

Проверка родовой специфичности ПЦР с праймерами *xfp*-F и *xfp*-R осуществляли с использованием ДНК микроорганизмов, относящихся к роду *Bifidobacterium*, также занимающих отличное филогенетическое положение. Суммарно количество штаммов бифидобактерий, использованных в проверке специфичности работы праймеров достигало 115. Количество штаммов, не принадлежащих к роду *Bifidobacterium* и использованных для проверки специфичности работы праймеров *xfp*-F и *xfp*-R было 58. Они принадлежали к 8 родам: *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Sporolactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Leuconostoc* spp., *Bacillus* spp., *E.coli*, *Gardnerella vaginalis*.

Всего было протестировано ДНК 115 штаммов бифидобактерий, 14 из которых были референтными, 69 – выделены из фекалий человека, 32 – из фекалий животных. Разработанный родоспецифический тест обладает 100%-ной специфичностью в отношении, по крайней мере, 10 видов бифидобактерий. Из штаммов с известным или определенным в ходе данного исследования систематическим положением в дальнейший анализ были включены следующие (см. таблицу Таблица 4).

**Таблица 4. Результаты ПЦР с праймерами *xfp*-F и *xfp*-R с бифидобактериями определенной видовой принадлежности.**

Вид	Количество протестированных штаммов	Из них референтных	Результаты ПЦР с праймерами Bif662 / Bif164	Результаты ПЦР с праймерами <i>xfp</i> -F/ <i>xfp</i> -R
<i>B.adolescentis</i>	13	2	Полож.	Полож.
<i>B.animalis</i>	3	3	Полож.	Полож.
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	6	1	Полож.	Полож.
<i>B.bifidum</i>	11	2	Полож.	Полож.
<i>B.breve</i>	1	1	Полож.	Полож.
<i>B.longum</i> subsp. <i>infantis</i>	4	1	Полож.	Полож.
<i>B.longum</i>	16	3	Полож.	Полож.
<i>B.pseudocatenulatum</i>	2	0	Полож.	Полож.
<i>B.pseudolongum</i>	6	0	Полож.	Полож.
<i>B.gallinarum/pullorum</i>	3	0	Полож.	Полож.

Чувствительность ПЦР теста с праймерами *xfp*-F и *xfp*-R измеряли количественно с использованием десяти и двукратных разведений культур бифидобактерий. Чувствительность теста составляет около 200 клеток/мл.

### **3 Результаты рестрикционного анализа (ARDRA) и сравнение данных с результатами мультиплексной видоспецифической ПЦР.**

В области гена *xfp* расположено большое количество специфических сайтов узнавания различных эндонуклеаз рестрикции, которые варьируют в широких пределах по величине и количеству образуемых фрагментов. Согласно предъявляемых нами требований, были выбраны и проведены испытания двух эндонуклеаз рестрикции – *Ama87I* (аналогичной *AvaI* и *Eco88I*, сайт узнавания – C↓YCGRG) и *Bsp19I* (аналогичной *NcoI*, сайт узнавания – C↓CATGG). Ожидаемые результаты после обработки эндонуклеазой *Ama87I* амплифицированного участка *xfp* гена были такими, как это представлено на рисунке 3.

При обработке ПЦР продуктов эндонуклеазой *Ama87I* наблюдали образование от 1 до 3 полос на электрофореze, соответствующих фрагментам длиной от 704 до 50 п.о. Таким образом, при анализе всех 12 штаммов, 10 идентифицированных по результатам мультиплексной ПЦР как *B.adolescentis* и 2 типовых, образовывались фрагменты величиной в 446, 204 и 50 п.о. (см. таблицу 5). Анализ 13 штаммов *B.longum* – 9 опытных

<i>B.adolescentis</i>	446	204	54	2 Ama87I
<i>B.animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	634		70	1 Bsp19I
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	704			
<i>B.bifidum</i>	Нет данных			
<i>B.breve</i>	Нет данных			
<i>B.pseudolongum</i>	590		114	1 Ama87I
<i>B.sp (1)</i>	590		44 70	1 Ama87I 1 Bsp19I
<i>B.dentium</i>	450	150	54 50	3 Ama87I
<i>B.gallinarum</i>	446	51 137	16 54	3 Ama87I 1 Bsp19I
<i>B.longum</i>	410	87 137	16 54	3 Ama87I 1 Bsp19I
<i>B.pullorum</i>	446	51 153	54	3 Ama87I
<i>B.sp (2)</i>	446	154	50 54	3 Ama87I

**Рисунок 3. Локализация сайтов специфического разрезания ДНК эндонуклеазами рестрикции Ama87I и Bsp19I в пределах 704 п.о. продукта ПЦР на ген *xfp*. Звездочками на рисунке отмечены сайты рестрикции Bsp19I, все остальные полосы – расположение сайтов рестрикции Ama87I.**

и 2 референсных – на электрофорезе наблюдали одну полосу, соответствующую фрагменту ДНК длиной в 446 п.о. Интересно, что все исследованные штаммы *B.longum* subsp. *infantis* - 1 типовой и 3 опытных – показывали образование двух фрагментов при рестрикции Ama87I, длиной в 650 и 446 п.о. Таким образом, рестрикция с использованием эндонуклеазы позволяет идентифицировать два подвида - *B.longum* subsp. *longum* и *B.longum* subsp. *infantis*.

**Таблица 5. Результаты рестриционного анализа амплифицированного по гену *xfp* участка ДНК штаммов бифидобактерий с использованием эндонуклеазы рестрикции Ama87I.**

Вид	Количество протестированных штаммов	Из них референсных	Фрагменты рестрикции Ama87I (п.о.)	Результаты видоспецифического определения в мультиплексной ПЦР
<i>B.adolescentis</i>	12	2	446, 204	<i>B.adolescentis</i>
<i>B.animalis</i>	3	3	704 (нет рестрикции)	Отриц.
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	12	1	704 (нет рестрикции)	Отриц.
<i>B.bifidum</i>	11	2	~650	<i>B.bifidum</i>

<i>B.breve</i>	1	1	704 (нет рестрикции)	<i>B.breve</i>
<i>B.longum</i> subsp. <i>infantis</i>	3	1	~650, 446	<i>B.longum</i> subsp. <i>infantis</i>
<i>B.longum</i>	13	4	446	<i>B.longum</i>
<i>B.pseudolongum</i>	5	0	~590, 114	Отриц.
Штамм и28	1	0	446, 270-290	Отриц.
Штамм 391 МГУ	1	0	446, 154	Отриц.
Штамм 395 МГУ	1	0	704 (нет рестрикции)	Отриц.

После рестрикционного анализа штаммов с использованием эндонуклеазы *Ama87I* 21 из них не показала рестрикции и была подвергнута обработке эндонуклеазой *Bsp19I* для выявления среди них представителей *B.animalis* subsp. *animalis*.

Среди этой 21 культуры только 3 показали образование фрагмента длиной в 634 п.о. в результате действия эндонуклеазы *Bsp19I* и были идентифицированы как *B. animalis* subsp. *animalis*. Остальные 18 не показали рестрикции после обработки эндонуклеазой *Bsp19I*. Среди них один штамм был заведомо известен – типовой штамм *B.breve* NCFB 2257. Таким образом, можно производить дифференциацию подвидов *B. animalis* subsp. *animalis* и *B.animalis* subsp. *lactis* с использованием эндонуклеаз *Ama87I* и *Bsp19I*. По всей видимости, *B.breve*, также не имеет сайтов рестрикции эндонуклеаз *Ama87I* и *Bsp19I* в пределах данной области генома, что, однако, трудно подтвердить, имея в распоряжении один штамм. Поэтому для выдвижения более достоверных выводов в случае идентификации вида *B.breve* предложенным рестрикционным методом необходимо накопить больше данных.

Результаты рестрикционного фингерпринтинга подтверждены при помощи нуклеотидного секвенирования по гену *xfp* и мультиплексной ПЦР.

#### 4 Секвенирование и филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК и *xfp*.

Были получены последовательности амплифицируемой области гена *xfp* для 21 культур бифидобактерий из опытных штаммов, а также для двух типовых штаммов – *B.breve* NCFB 2257 и *B.infantis* ATCC 15697.

Для проведения сравнительного анализа было построено молекулярное выравнивание, куда вошло 43 последовательностей, 21 – штаммов нашей коллекции и 22 – представленные в GeneBank. Из них 3 – *B.adolescentis* (все типовые), 4 – *B.animalis* subsp. *animalis* (все типовые), 8 – *B.animalis* subsp. *lactis* (1 типовой и 7 опытных), 3 – *B.bifidum* (1 типовой и 2 опытные), 1 типовой штамм *B.breve*, 1 типовой штамм *B.longum* subsp. *infantis*, *B.longum* (4 референсные и 3 опытные), *B.pseudolongum* (1 типовой и 6

опытных), 2 типовых штамма *B.pullorum*, 1 типовой штамм *B.gallinarum* и 3 опытных культуры, дифференциация которых между *B.pullorum* и *B.gallinarum* не была определена. Как отмечено в обзоре литературы к диссертации, данные два вида очень близки между собой и межвидовая дифференциация штаммов в данном случае является не простой задачей. Видовая принадлежность двух штаммов из коллекции МГУ осталась неопределенной, а штамм и28, не смотря на особенности рестрикции Ama87I, был условно идентифицирован как *B.adolescentis* на основании сравнения последовательности амплифицируемой области гена *xfp*.

В результате сравнительного анализа последовательности гена Фр-6-Ф-фосфокетолазы бифидобактерий с праймерами *xfp-F* и *xfp-R* мы нашли, что данная область обладает высоким консерватизмом. Наибольшая вариабельность последовательности приходится на последние 30% амплифицируемого участка, в котором наблюдается высокая концентрация одно-, двух- и трехнуклеотидных замен. Таким образом, данная зона может быть определяющей при подборе диагностических критериев для идентификации штаммов на уровне вида.

Особенно ценными оказались последовательности исследуемой области гена *xfp* видов *B.breve*, *B.bifidum* и *B.pseudolongum*, для которых не было возможности оценить вероятные результаты рестрикции, и соответственно, возможность использования предложенного в настоящей работе рестрикционного метода идентификации данных видов в силу отсутствия соответствующих последовательностей в международных базах данных.

Анализ единственной последовательности *B.breve* не выявил у него видимых отличий от остальных видов бифидобактерий в пределах амплифицируемой области гена *xfp*, откуда следует, что данная область не подходит для идентификации изолятов вида *B.breve*. Это подтверждено и результатами рестрикционного анализа, где было показано отсутствие продуктов расщепления амплификата гена *xfp* при обработке его эндонуклеазами Ama87I и Vsp19I.

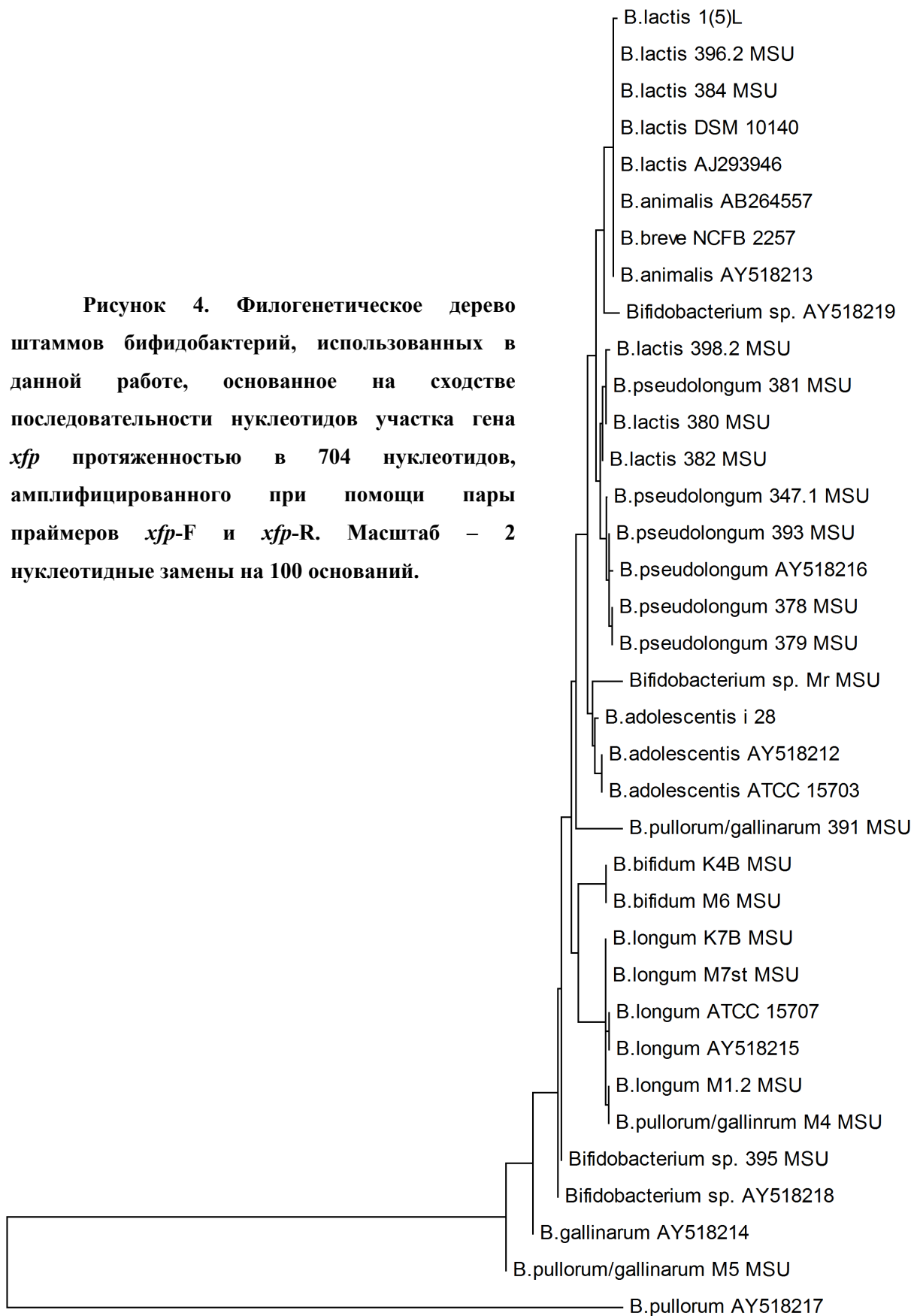
По результатам проведенного сравнительного анализа штаммы коллекции МГУ были идентифицированы следующим образом:

- К4В МГУ и М6 МГУ – *B.bifidum*;
- 347.1 МГУ, 378 МГУ, 379 МГУ, 381 МГУ, 393 МГУ – *B.pseudolongum*;
- 1(5) L, 380 МГУ, 382 МГУ, 384 МГУ, 396.2 МГУ, 398.2 МГУ – *B.lactis*;
- 7 st M МГУ, К7В МГУ, М1.2 – *B.longum*;
- 391 МГУ, М4 МГУ, М6 МГУ – *B.pullorum* / *B.gallinarum*;
- Mr МГУ – *Bifidobacterium* sp.;

- 395 МГУ – *Bifidobacterium* sp.;
- и 28 – *B.adolescentis* (?)

При компьютерной обработке результатов секвенирования участка гена *xfp* и сравнительном анализе полученных нами последовательностей с последовательностями того же гена референтных штаммов было построено филогенетическое дерево. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 4. Дендрограммы на основании последовательностей исследуемой области с использованием схем статистического анализа в целом подтверждают наши предположения о систематическом положении выделенных штаммов. Было показано, что область гена *xfp*, амплифицируемая в ПЦР с праймерами *xfp-F* и *xfp-R* обладает достаточным потенциалом для идентификации по крайней мере пяти видов бифидобактерий. На построенном на основании сравнения последовательностей филогенетическом дереве видно, что виды *B.animalis*, *B.pseudolongum*, *B.adolescentis*, *B.bifidum* и *B.longum* образуют отдельные кластеры. А вот штаммы, идентифицированные как *B.pullorum/gallinarum*, заняли неопределенное положение в дереве. Штамм *B.breve* попал в кластер с представителями вида *B.animalis*. Последние данные свидетельствуют о возможно недостаточной универсальности данной области генома для идентификации видов *B.pullorum/gallinarum* и *B.breve*.

**Рисунок 4. Филогенетическое дерево штаммов бифидобактерий, использованных в данной работе, основанное на сходстве последовательности нуклеотидов участка гена *xfp* протяженностью в 704 нуклеотидов, амплифицированного при помощи пары праймеров *xfp-F* и *xfp-R*. Масштаб – 2 нуклеотидные замены на 100 оснований.**



0.2

## ВЫВОДЫ

1. Подобрана оптимальная питательная среда для устойчивого культивирования бифидобактерий. В качестве селективного компонента наиболее эффективно использование антибиотика мупироцина в конечной концентрации его 100 мкг/мл.
2. На основе родоспецифической ПЦР с праймерами в области гена *xfp* разработан молекулярный тест для идентификации бифидобактерий, и была доказана его высокая специфичность.
3. На основе рестрикции амплифицируемого участка гена *xfp* был разработан видоспецифический тест для идентификации бифидобактерий, который позволяет идентифицировать виды *B.adolescentis*, *B.longum*, *B.bifidum*, *B.animalis* и подвиды *B.longum* subsp. *longum* и *B.longum* subsp. *infantis*, *B.animalis* subsp. *animalis* и *B.animalis* subsp. *lactis*.
4. На основании секвенирования участка гена *xfp*, амплифицируемого в новой родоспецифической ПЦР, был проведен сравнительный анализ путем построения молекулярного выравнивания и филогенетического дерева.
5. Установлено, что бифидобактерии хорошо переносят лиофильное высушивание без внесения дополнительных криопротекторных веществ, так как разработанная обогащенная бифидум-среда сама выступает в качестве криопротектора.



## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. Пиксасова О. Функциональное питание: мода или необходимость? // Экология и жизнь, 2009, № 3, стр. 80-84.

### Статьи в нерецензируемых журналах:

2. Piksasova O.V., Kornienko M.A., Tsygankov Yu.D., Netrusov A.I. Methods of Molecular Identification as Important Tools for Control and Certification in Microbiology // Electronic Journal of Natural Sciences, Jan 2009, Vol. 2009, Issue 1, pp. 35-49.
3. Piksasova O.V., Cherdintseva T.A., Kotova I.B., Netrusov A.I. Novel tool for genus-specific identification and species determination of *Bifidobacterium* sp. // Applied and Environmental Microbiology (submitted).

### Тезисы докладов:

1. Piksasova O.V., Kornienko M.A., Tsygankov Yu.D., Netrusov A.I. Methods of Molecular Identification as Important Tools for Control and Certification in Microbiology // Proceedings of the International Probiotic Conference "Enteric Bacteria and Inflammatory Bowel Disease", Republic of Armenia, Tsakhkadzor, October 2- 4, 2008, page 57.
2. Piksasova O.V., Cherdintseva T.A., Kotova I.B., Ulumdjiev A.N., Netrusov A.I. Collection of Potential Strains of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Natural Sources // Proceedings of the International Probiotic Conference "EUPROBIO 2008", Poland, Krarow, October 15-17, 2008. Krakow: Polskie Towarzystwo Probiotyczne i Prebiotyczne, page 72.
3. Piksasova O., Aires J., Cherdintseva T.A., Kotova I.B., Netrusov A. Novel Tool for Genus-Specific Identification of Bifidobacteria // Proceedings of the 3rd Congress of European Microbiologists FEMS, Gothenburg, Sweden, June 28 - July 2, 2009. № 2532.
4. Сидорук К.В., Левитин Е.И., Пиксасова О.В. Универсальный метод выделения высокомолекулярной ДНК из микроорганизмов, основанный на предварительной обработке биомассы раствором ацетата аммония. // Актуальные вопросы генетики, радиобиологии и радиоэкологии: Вторые чтения, посвящённые памяти В.И. Корогодина и В.А. Шевченко (Дубна - Москва, 12-13 января 2009 г.): Материалы, тезисы докладов. - Дубна: ОИЯИ, 2008. - С. 100.
5. Пиксасова О.В., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Новый метод идентификации бифидобактерий на уровне рода и вида // Применение современных биотехнологий в пищевой промышленности: Семинар-выставка на базе Российского центра науки и культуры в г. Ханое (Вьетнам, 14-20 ноября 2009 г.): Материалы, тезисы докладов (в печати).