

На правах рукописи

Харченко Наталья Васильевна

**ВЫДЕЛЕНИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ
ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ**

Специальность
03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2016

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

Нетрусов Александр Иванович,
доктор биологических наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Ушакова Нина Федоровна,
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН), заведующая лабораторией инновационных технологий.

Кирюхина Наталия Владимировна,
кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт Медико-Биологических проблем РАН, научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

Защита состоится 04.10.2016 в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел.8(495)939-54-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 года

Ученый секретарь
диссертационного совета



Н.Ф.Пискункова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Микроорганизмы рода *Bifidobacterium* широко распространены в природе и являются одними из основных представителей микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека и животных. Бифидобактерии обладают высокой биологической полифункциональной активностью, что определяет их широкое практическое использование как в качестве пробиотиков, так и в производствах пищевых молочнокислых продуктов (Ferdousi et al., 2013). Среди бактерий, применяемых как пробиотики, наиболее широко известны своими полезными свойствами *B. bifidum*, *B. infantis*, которые первыми из молочнокислых бактерий (МКБ) заселяют кишечник новорожденного ребенка и присутствуют там в форме устойчивого симбиоза весь период до окончания грудного вскармливания (Набокова и др., 2014), с последующей заменой в процессе онтогенеза на *B. adoliensis*, оказывая благотворное влияние на здоровье человека (Mshvildadze et al., 2010).

В условиях массивного антропогенного воздействия на биосферу, несбалансированного и ухудшающегося по качеству питания, беспорядочного приема лекарственных средств и неблагоприятного влияния окружающей среды происходят нарушения в составе микробиоты человека и животных. С конца XX века фиксируют изменения в видовом составе бифидобактерий в ЖКТ, в том числе снижение ее видового разнообразия у детей раннего возраста, в том числе у детей, рожденных естественным путем (Булатова, 2011). Поэтому в настоящее время в молочной промышленности и производствах детского питания широко используют прием обогащения кисломолочных продуктов пробиотическими культурами, особенно бифидобактериями (Buss et al., 2004). Продолжаются и расширяются исследования МКБ, направленные на более глубокое изучение физиологии бактерий-пробиотиков, их взаимодействий с организмом хозяина и механизмов, ответственных за положительное влияние МКБ на здоровье человека (Шендеров, 2001; Vaughan et al., 2002; Reid et al., 2003; Vocolé, Thomann, 2005).

Этим объясняется большая теоретическая и практическая заинтересованность в поиске новых штаммов бифидобактерий и изучении их биотехнологических характеристик. Однако МКБ и особенно бифидобактерии очень плохо хранятся. Поэтому не менее важны разработки методов их длительного хранения, обеспечивающего как высокую численность выживающих клеток, так и сохранение важных биологических свойств. Отсюда оценка новых выделенных штаммов МКБ должна основываться на комплексе важных биотехнологических характеристик, включая такие как стрессоустойчивость, кислотообразование, антибиотикорезистентность, антагонистическая активность. После выделения в чистые культуры и молекулярно-генетической идентификации выделенных штаммов, необходима оценка их физиологических свойств, сохраняющихся при их длительном (6-12 мес.) хранении с последующим отбором наиболее перспективных штаммов,

обладающих перечисленными выше характеристиками для создания эффективных пробиотических препаратов.

Цель работы

Выделить новые перспективные штаммы бифидобактерий, обладающие высокой жизнеспособностью и сохраняющие важные пробиотические свойства при долговременном хранении, для дальнейшего конструирования пробиотических препаратов и использования их в пищевой промышленности.

Задачи

- 1) Выделить из природных источников устойчиво растущие культуры бифидобактерии и определить методами молекулярно-генетического типирования их видовую принадлежность.
- 2) Адаптировать методы хранения МКБ для бифидобактерий по подбору эффективных концентраций криопротекторов и показателям температурных режимов лиофилизации.
- 3) Оценить динамику сохранения устойчивости выделенных штаммов бифидобактерий к желудочному, кишечному и окислительному стрессам при их долговременном (6-12 мес.) хранении.
- 4) Определить антимицробную активность и антибиотикорезистентность выделенных штаммов бифидобактерий.
- 5) На основании совокупности полученных результатов провести отбор наиболее перспективных штаммов бифидобактерий как основы для пробиотических препаратов и добавок к пищевым продуктам.

Научная новизна

Получены новые штаммы бифидобактерий, идентифицированные с использованием молекулярно-генетических методов на основе ПЦР-анализа и последующего секвенирования амплифицированных последовательностей гена 16S рРНК.

Метод лиофилизации молочнокислых бактерий адаптирован для длительного хранения бифидобактерий по показателям сохранения, как высокой численности жизнеспособных клеток, так и важных пробиотических свойств.

На основании изучения комплексных характеристик выделенных бифидобактерий отобраны и рекомендованы к применению три штамма, обладающие высокой стрессоустойчивостью (к желудочному, кишечному и окислительному стрессам), продуктивностью лактата, антибактериальной активностью и низкой антибиотикорезистентностью.

Практическая значимость работы

В результате исследований коллекция МКБ кафедры микробиология биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова пополнена 6 новыми штаммами бифидобактерий, выделенными из фекалий млекопитающих и младенцев. Секвенированные последовательности генов 16S рРНК выделенных штаммов бифидобактерий помещены в GenBank.

Разработанные модификации методов лиофилизации культур бифидобактерий переданы для применения в коллекционной работе кафедры микробиологии. По результатам морфологического изучения выделенных в

чистые культуры бифидобактерий создана фототека колоний и микропрепаратов их клеток, предназначенная для коллекционной и учебной работы. Три новых штамма бифидобактерий, обладающих выраженными и хорошо сохраняющимися при длительном хранении пробиотическими свойствами, рекомендованы в качестве создания эффективных пробиотиков для пищевой промышленности и пробиотических препаратов.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на: Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов, секция Биология" (Москва, 7-11 апреля, 2014); Всероссийском симпозиуме с международным участием "Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов" (Москва, 2014); XIII Международной заочной научно-практической конференции "Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии" (Москва, 2014).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 3 статьи в журналах рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 141 странице и содержит 21 рисунок, 28 таблиц и 134 литературные ссылки. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы.

СОЖЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы, составленный по материалам отечественных (45) и зарубежных (96) публикаций содержит современные сведения о биологических и пробиотических свойствах бифидобактерий, их распространении и роли в организме хозяина. Рассмотрены основные области применения бифидобактерий.

Материалы и методы исследований

Объекты исследования. Бифидобактерий выделяли из фекальных масс млекопитающих, из рациона питания которых были исключены продукты, препараты и смеси, содержащие бифидобактерии.

Условия культивирования бифидобактерий. Для выделения и культивирования бифидобактерий использовали среду, содержащую (г/л): панкреатический гидролизат казеина - 30.0; экстракт пекарских дрожжей - 5.0; глюкоза - 7.5; лактоза - 2.5; цистеин - 0.5; NaCl - 2.5; MgSO₄ - 0.5; аскорбиновая кислота - 0.5; ацетат натрия - 0.3; гидролизат рыбной муки - 50.0; твин 80 - 1.0 мл; 50%-ный раствор лактулозы - 5.0 мл; гемин - 5 мг; плотные среды содержали агар - 15-20 (Пикасова, 2009). Культивирование проводили при 37 °С в анаэробных условиях.

Идентификация бифидобактерий. Для диагностики бифидобактерий использовали молекулярные методы ПЦР-анализа. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «ДНК-сорб-АМ» в соответствии с протоколом (Амплисенс, Москва). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием специфических праймеров (табл. 1), синтезированных в компаниях Синтол (Москва, Россия) и Eurogenetic S.A. (Бельгия). Анализ последовательностей 16S рРНК проводили с помощью программного пакета BLAST.

Таблица 1. Родоспецифические олигонуклеотидные праймеры для идентификации *Bifidobacterium* sp. при ПЦР анализе.

Ген	Название	Последовательность (5'-3')	ПЦР-продукт (п.о.)	Лит. источник
ген16S рРНК	<i>g-Bifid-F</i>	CTCCTGGAAACGGGTGG	557	Matsuki et al., 2003
	<i>g-Bifid-R</i>	GGTGTTCCTCCCGATATCTAC A		
ген16S рРНК	<i>Bif164</i>	GGGTGGTAATGCCGGATG	523	
	<i>Bif662</i>	CCACCGTTACACCGGGAA		
ген <i>xfp</i>	<i>xfp-F</i>	CGGCTGGCAGTCCAACAA	704	Пикасова, 2009
	<i>xfp-R</i>	GGTTGTTCTTGATGATGTCTG C		

Лиофилизация бифидобактерий. Для лиофилизации бифидобактерий 0.2 мл концентрированной (9.8×10^9 кл/мл) суспензии клеток культур из стационарной фазы роста помещали в стерильные эппендорфы, добавляли в разных вариантах по 0.1 мл КЖ, РФ (реактивирующий фактор, выделенный из *Luteococcus japonicus* subsp. *casei*), 0.1 мл обезжиренного молока, криопротекторов: глюкозы 5%, сахарозы 5%, РФ + криопротектор. Контролем служила суспензия клеток без внесения дополнительных веществ. Подготовленные варианты инкубировали в течение 1 ч, замораживали в морозильной камере при температуре -20 °С или -70 °С помещали в лиофильную сушку «Labconco» (США), высушивали в течение 24 ч.

Жизнеспособность клеток определяли по численности колониеобразующих единиц (КОЕ) при высеве десятичных разведений культур бифидобактерий на агаризованную среду (1.5%) вышеприведенного состава. Чашки Петри с посевами бифидобактерий инкубировали в анаэробных условиях при 37 °С.

Анализ стрессоустойчивости бифидобактерий.

Для имитации **желудочного стресса** использовали искусственный желудочный сок (ЖС) следующего состава (г/л): NaCl (Sigma S9625) – 2.2; L-молочная кислота (Sigma L1750) – 9.9 (0.11 М); пепсин свиной (Sigma P7125) 600-1800 единиц/мг – 3.5; рН 2.7 ± 0.02 (доводили 35% NaOH), рН в эксперименте 3.10 ± 0.10 . В опыте к 1 мл искусственного ЖС, а в контроле - к 1 мл среды, добавляли 0.1 мл исследуемой культуры из стационарной фазы роста. Оба варианта инкубировали в течение 30 мин при 37 °С, отбирали пробы и определяли выживаемость бактерий по числу КОЕ/мл.

Для имитации **кишечного стресса** использовали кишечный сок (КС) следующего состава (г/л): желчные соли (желчь свиньи Sigma B8631) – 3.3; карбонатный буфер NaHCO_3 (Sigma S8875) – 16.5; рН 6.3. В опыте 1 мл искусственного КС, а в контроле 1 мл среды, добавляли к 0.1 мл культуры стационарной фазы роста. Оба варианта инкубировали в течение 5 ч, при 37 °С, отбирали пробы и определяли число выживших клеток.

Для определения устойчивости бифидобактерий к **окислительному стрессу** два пенициллиновых флакончика: опытный (закрытый ватной пробкой) и контрольный (закрытый резиновой пробкой и алюминиевым колпачком) с 5 мл среды инокулировали 1 сут. культуры бифидобактерий. Культуры инкубировали при 37 °С 30 мин, после чего отбирали пробы (0.1 мл) для определения числа выживших клеток.

Продукты метаболизма бифидобактерий определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на приборе Crystal 2000М (ЗАО СКБ "Хроматэк", г. Йошкар-Ола).

Антибиотическую активность бифидобактерий методом лунок (Нетрусов, 2005) по диаметру подавления роста, поверхностных тест-культур условно-патогенных штаммов бактерий (*Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Устойчивость бифидобактерий к антибиотикам (тетрациклину) определяли методом лунок (Нетрусов, 2005).

Все эксперименты выполняли в трёх повторностях.

Результаты и обсуждение

1. Выделение новых штаммов бифидобактерий

Выделение бифидобактерий из фекалий млекопитающих: младенца, козы, кролика и поросенка осуществляли методом многократных чередующихся пересевов, выросших на селективной питательной среде отдельных колоний, характерных для бифидобактерий, на полужидкую и агаризованную среды до этапа получения однотипных устойчиво растущих в течение 5-кратных пересевов чистых культур бифидобактерий.

В результате проведенной работы было выделено 43 клона (штамма). Результаты изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств позволили предположительно отнести их к роду *Bifidobacterium*. Однако, при проведении ПЦР анализа, с использованием универсальных для бифидобактерий праймеров (табл.1), взятых в соответствии с литературными данными, из 43 чистых культур предполагаемых бифидобактерий к этому роду были отнесены только 8 штаммов.

Генотипирование выделенных штаммов бифидобактерий проводили на основе секвенирования гена 16S рРНК с применением праймеров приведенных в табл.2. Согласно полученным результатам, выделенные бифидобактерии отнесены к видам *B.bifidum* и *B. animalis*. Последовательности фрагментов генов выделенных новых штаммов бифидобактерий были аннотированы и зарегистрированы в GenBank под номерами, указанными в таблице 2.

Таблица 2. Видовая принадлежность выделенных штаммов бифидобактерий.

Образец	Праймеры	Количество определенных нуклеотидов	№ в GenBank
<i>B. bifidum</i> КМ МГУ №468	357f-1492r	1135	KJ160509
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	27f-519r; 357f-1492r; 27f-1100r	1465	KJ160510
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	27f-519r; 357f-1492r; 27f-1100r	1465	KJ160511
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	27f-519r; 357f-1492r; 27f-1100r	1465	KJ160514
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №472	27f-519r и 357f-1492r; 27f-1100r	1465	KJ160515
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №473	357f-1492r	1135	KJ160516
<i>L. plantarum</i> КМ МГУ №501	357f-1492r; 27f-1100r	1465	KJ160513

<i>L. plantarum</i> КМ МГУ №502	357f-1492r	1135	KJ160509
---------------------------------	------------	------	----------

2. Выживаемость бифидобактерий при длительном хранении

Технологические операции по хранению бифидобактерий разрабатывали с учетом их культуральных особенностей и чувствительности к повреждающим факторам. В рамках поставленных задач была проведена комплексная работа по подбору и оптимизации процедур лиофилизации для выделенных штаммов бифидобактерий. Для сохранения жизнеспособности лиофилизированных клеток существуют два наиболее опасных этапа: замораживание и долговременное хранение лиофилизированных образцов. Соответственно было необходимо подобрать: температурные режимы лиофилизации и эффективные криопротекторы.

Применение криопротекторов в составе защитных сред, изученных для низкотемпературной консервации бактерий - широко распространённый приём (Mubalec et al. 2003). Из группы углеводов для хранения МКБ при отрицательных температурах чаще всего используют глюкозу, сахарозу и лактозу в концентрациях 3-15% (Hulalu, 2009). Выбор криопротекторов в настоящей работе был ограничен следующими требованиями: отсутствием токсичности; возможностью их использования в составе готового продукта в пищевой промышленности и фармацевтике; экономичностью. Было установлено, что совместное использование сахарозы и глюкозы в концентрациях 5% и выше в обезжиренном молоке наилучшим образом защищает бифидобактерии от повреждений клеточных структур при замораживании (табл. 3 и 4). Анализ полученных результатов показал целесообразность применения сахаров в концентрации не выше 5%.

Таблица 3. Выживаемость лиофилизированных бактерий рода *Bifidobacterium* при использовании различных концентраций сахарозы в качестве криопротектора (хранение в течение 1 мес.).

Наименование культуры	Концентрация сахарозы								
	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
	Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/г)								
<i>B. bifidum</i> КМ МГУ №468	3.8× 10 ³	4.3× 10 ⁵	5.8× 10 ⁶	4.8× 10⁷	4.3× 10 ⁷	3.7× 10 ⁷	4.5× 10 ⁷	4.6× 10 ⁷	4.3× 10 ⁷
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	2.6× 10 ⁴	9.0× 10 ⁴	9.3× 10 ⁴	9.6× 10⁶	8.6× 10 ⁶	9.2× 10 ⁶	9.3× 10 ⁶	9.7× 10 ⁶	9.5× 10 ⁶
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	4.3× 10 ³	8.0× 10 ³	7.3× 10 ⁴	8.3× 10⁵	8.0× 10 ⁵	8.4× 10 ⁵	7.9× 10 ⁵	8.0× 10 ⁵	8.1× 10 ⁵
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	2.9× 10 ⁴	7.9× 10 ³	7.9× 10 ⁴	7.9× 10⁵	7.3× 10 ⁵	7.2× 10 ⁵	7.5× 10 ⁵	7.6× 10 ⁵	7.9× 10 ⁵

<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> KM МГУ №472	3.7× 10 ²	6.7× 10 ³	8.4× 10 ⁴	9.7× 10⁶	9.1× 10 ⁶	9.5× 10 ⁶	9.7× 10 ⁶	9.3× 10 ⁶	9.6× 10 ⁶
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> KM МГУ №473	3.9× 10 ³	7.9× 10 ⁴	8.8× 10 ⁵	8.9× 10⁶	8.7× 10 ⁶	8.1× 10 ⁶	8.9× 10 ⁶	8.4× 10 ⁶	8.3× 10 ⁶

Таблица 4. Выживаемость лиофилизированных бактерий рода *Bifidobacterium* при использовании различных концентраций глюкозы в качестве криопротектора (хранение в течение 1 мес.).

Наименование культуры	Концентрация глюкозы								
	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
	Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/г)								
<i>B. bifidum</i> KM МГУ №468	5.8× 10 ⁴	4.9× 10 ⁵	6.8× 10 ⁶	4.8× 10⁹	4.3× 10 ⁹	3.7× 10 ⁹	4.5× 10 ⁹	4.2× 10 ⁹	4.0× 10 ⁹
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> KM МГУ №469	2.6× 10 ⁶	9.0× 10 ⁶	9.3× 10 ⁷	9.6× 10⁸	8.6× 10 ⁸	8.9× 10 ⁸	8.6× 10 ⁸	9.6× 10 ⁸	9.5× 10 ⁸
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> KM МГУ №470	4.9× 10 ³	8.0× 10 ⁴	5.3× 10 ⁶	8.3× 10⁷	8.0× 10 ⁷	8.4× 10 ⁷	7.9× 10 ⁷	8.0× 10 ⁷	8.1× 10 ⁷
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> KM МГУ №471	6.9× 10 ⁶	4.9× 10 ⁷	8.9× 10 ⁷	7.9× 10⁸	7.3× 10 ⁸	7.2× 10 ⁸	7.5× 10 ⁸	7.6× 10 ⁸	7.9× 10 ⁸
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> KM МГУ №472	4.7× 10 ⁵	8.7× 10 ⁵	8.9× 10 ⁶	9.7× 10⁷	9.1× 10 ⁷	9.0× 10 ⁷	8.7× 10 ⁷	9.3× 10 ⁷	9.7× 10 ⁷
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> KM МГУ №473	3.9× 10 ⁶	8.9× 10 ⁷	6.8× 10 ⁷	8.9× 10⁸	8.7× 10 ⁸	8.1× 10 ⁸	8.9× 10 ⁸	8.4× 10 ⁸	8.3× 10 ⁸

Другой важный параметр при лиофилизации бифидобактерий - температура заморозки клеток, которая согласно данным в литературы варьирует в широком диапазоне, начиная от -20 °С и ниже и хранение лиофилизатов - от -20 °С и ниже (Макаренко, 2010). При лиофилизации были применены температурные режимы, указанные в табл.5.

Проведенный анализ выживаемости бифидобактерий при различных температурных режимах их лиофилизации хранения в течение 12 мес.

показал, что наибольшее число жизнеспособных бактерий обеспечивается режимом замораживания и хранения при -70°C . При изучении динамики выживания бифидобактерий, лиофилизированных при разных режимах (табл. 5), была выявлена штаммовая зависимость. Наилучшая выживаемость через 12 мес. хранения была отмечена у *B. bifidum* №468, хуже всего хранились штаммы *B. animalis* subsp. *lactis* №471 и 473 и 472, у которого уже на 9 мес. хранения жизнеспособность сохранялась только в лиофилизатах, полученных при температурном режиме $-70/-70^{\circ}\text{C}$. При этом следует отметить, что достаточно хорошо выживали бифидобактерии, лиофилизированные в режиме $-70/-40^{\circ}\text{C}$, который представляется экономически более перспективным для длительного хранения пробиотических препаратов.

Таблица 5. Выживаемость бактерий рода *Bifidobacterium*, лиофилизированных при различных температурных режимах, при хранении в течение 12 мес.

Наименование культуры	Время (месяц)	Вариант замораживания хранения			
		$-20/-2-3^{\circ}\text{C}$	$-20/-20^{\circ}\text{C}$	$-70/-70^{\circ}\text{C}$	$-70/-40^{\circ}\text{C}$
		Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл)			
<i>Bifidobacterium bifidum</i> КМ МГУ №468	0	4.8×10^{10}	4.8×10^{10}	4.8×10^{10}	4.8×10^{10}
	1	8.0×10^6	4.6×10^8	8.3×10^9	5.3×10^8
	6	6.4×10^5	8.7×10^6	9.6×10^8	5.4×10^7
	12	7.0×10^3	1.1×10^6	4.0×10^7	1.9×10^6
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	0	9.6×10^{10}	9.6×10^{10}	9.6×10^{10}	9.6×10^{10}
	1	8.9×10^9	6.3×10^9	7.6×10^9	9.3×10^9
	6	1.5×10^6	1.8×10^8	4.6×10^8	4.6×10^7
	12	1.2×10^4	4.0×10^4	4.0×10^5	2.1×10^5
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	0	8.3×10^9	8.3×10^9	8.3×10^9	8.3×10^9
	1	6.4×10^8	7.4×10^8	7.8×10^8	2.3×10^9
	6	1.0×10^6	6.4×10^7	9.3×10^7	5.3×10^7
	12	0	1.8×10^5	7.3×10^5	7.0×10^3
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	0	7.9×10^9	7.9×10^9	7.9×10^9	7.9×10^9
	1	5.3×10^7	2.4×10^9	8.6×10^8	2.6×10^8
	6	2.9×10^6	4.0×10^6	1.9×10^6	9.0×10^5
	12	0	3.0×10^4	2.3×10^4	6.0×10^3
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №472	0	9.7×10^9	9.7×10^9	9.7×10^9	9.7×10^9
	1	3.6×10^7	6.4×10^7	7.2×10^8	6.3×10^7
	6	1.8×10^4	8.0×10^4	4.3×10^6	1.7×10^5
	9	0	0	6.3×10^5	0
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №473	0	8.9×10^9	8.9×10^9	8.9×10^9	8.9×10^9
	1	7.6×10^8	8.4×10^8	7.6×10^9	8.1×10^8
	6	2.3×10^5	1.4×10^7	5.7×10^7	1.7×10^5
	12	0	1.6×10^4	8.3×10^4	0

2.1. Влияние реактивирующего фактора (РФ) на выживаемость бифидобактерий при лиофилизации

По литературным данным для ряда микроорганизмов показана способность синтезировать внеклеточные низкомолекулярные полипептиды - РФ- фактор, повышающий численность выживающих клеток в условиях летальных воздействий стрессоров, таких как УФ-облучение и др. (Воробьева, 2015). О действии РФ в условиях холодового шока ничего не было известно. В работе был исследован полипептид, выделенный из *Luteococcus casei*, для которого проверяли наличие криозащитных свойств в отношении бифидобактерий. Было доказано, что внеклеточный полипептид *L. casei* проявляет защитный эффект при его внесении в суспензию бифидобактерий индивидуально или вместе с криопротектором (5 % сахарозой и 5 % глюкозой). Из результатов, представленных в табл. 6 следует, что через 1 мес. хранения в варианте при использовании культуральной жидкости (КЖ) в качестве защитного фактора, численность жизнеспособных клеток снизилась на 2 порядка, а через 2 мес. хранения – на 4 порядка. В варианте лиофилизации с криопротекторами сохранялась высокая численность клеток, однако при использовании РФ или К+РФ число выживших клеток было, до 10^9 кл/мл. При этом была отмечена сохранность морфологических признаков бифидобактерий, а также быстрое восстановление ростовых способностей. Эти факторы следует учитывать при разработке рекомендаций использования бифидобактерий в качестве пробиотических препаратов, так как существует проблема быстрого оживления лиофилизированных бактерий при их введении в организм.

Таблица 6. Защитное действие РФ и КЖ *L. casei* при лиофилизации клеток *B. bifidum* КМ МГУ №468.

Время хранения, мес	Интактные клетки (до лиофилизации)	Клетки, лиофилизированные без криопротектора	Использованные криопротекторы:			
			К	КЖ	РФ	К + РФ
Число КОЕ на мл суспензии						
0	96×10^9					
1		8.9×10^2	7.2×10^9	7.4×10^8	8.0×10^9	8.6×10^9
2		1.9×10^2	5.6×10^8	5.4×10^6	3.5×10^9	5.6×10^8

3. Изучение сохранности пробиотических свойств в динамике хранения лиофилизированных бифидобактерий

Среди наиболее важных факторов, влияющих на эффективность пробиотических штаммов, многие авторы отмечают необходимость сохранения жизнеспособности клеток при прохождении желудочно-кишечного тракта (Ардатская и др. 2006; Минушкин и др. 2011). Поэтому особое внимание было уделено изучению стрессоустойчивости выделенных новых штаммов

бифидобактерий, хранящихся в лиофилизированном виде. Стрессоустойчивость бифидобактерий изучали в моделях *in vitro*, имитирующих желудочно-кишечные стрессы.

3.1. Устойчивость бифидобактерий к желудочному и кишечному стрессам.

Проведенным анализом установлено, что исследуемые новые штаммы бифидобактерий, хранящиеся до 12 мес. в виде лиофилизатов, демонстрировали штаммовую зависимость сохранения устойчивости к желудочному стрессу (табл. 6). Наибольшая стрессоустойчивость отмечена у штамма *B. animalis* subsp. *lactis* №472 и снижение выраженности этого признака в ряду: *B. animalis* subsp. *lactis* №469, 478, 471, 470 и 473, которые теряли устойчивость к данному стрессу к концу хранения (12 мес.). Следует отметить, что согласно литературным данным бифидобактерии проявляют большую чувствительность к кислотным стрессам (Чичерин и др. 2013). Поэтому воздействие желудочного сока относится к разряду основных критических факторов, влияющих на выживаемость пробиотических микроорганизмов при их пероральном применении. Согласно результатам, представленным в таблице 7, наименьшей устойчивостью к кишечному стрессу, так же, как и к желудочному обладали штаммы *B. animalis* subsp. *lactis* №470 и 473, а наиболее высокой – штаммы №478,471 и 469.

Таблица 6. Устойчивость выделенных бактерий рода *Bifidobacterium* к желудочному стрессу после их реактивации из лиофилизированных образцов.

№	Штамм	Время хранения (месяцы)	Вариант подготовки и хранения клеток			
			-20/-2-3 °С	-20/-20 °С	-70/-70 °С	-70/-40°С
			Степень устойчивости			
1	<i>B. bifidum</i> КМ МГУ №468	8	10.0	5.0	4.0	3.0
		12	10.0	6.0	5.0	6.0
2	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	8	10.0	2.0	3.0	4.0
		12	10.0	3.0	5.0	4.0
3	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	8	10.0	10.0	10.0	10.0
		12	н/о	10.0	10.0	10.0
4	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	8	6.0	4.0	4.0	4.0
		12	н/о	6.0	6.0	6.0
5	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	8	н/о	3.0	3.0	3.0

	КМ МГУ №472	12	н/о	н/о	3.0	н/о
6	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №473	8	6.0	3.0	2.0	10.0
		12	н/о	10.0	10.0	н/о

*Примечание: RD – степень устойчивости (Pinto et al., 2006); «очень хорошо» - $RD \leq 5$; «хорошо» - $5 < RD \leq 10$; «приемлемо» - $10 < RD \leq 15$; «неприемлемо» - $RD > 15$; н/о – не определяли.

** Полные версии таблиц представлены в диссертации.

Таблица 7. Устойчивость выделенных бактерий рода *Bifidobacterium* к кишечному стрессу после длительного хранения.

№	Видовое название	Время хранения (месяц)	Вариант подготовки и хранения клеток			
			-20/ -2-3 °С	-20/-20 °С	-70/-70 °С	-70/-40°С
			Степень устойчивости			
1	<i>B. bifidum</i> КМ МГУ №468	8	3.0	3.0	2.0	3.0
		12	10.0	6.0	3.0	3.0
2	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	8	4.0	3.0	2.0	3.0
		12	10.0	4.0	4.0	4.0
3	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	8	10.0	10.0	10.0	10.0
		12	н/о	10.0	10.0	10.0
4	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	8	4.0	4.0	3.0	3.0
		12	6.0	4.0	3.0	3.0
5	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №472	8	н/о	2.0	3.0	3.0
		12	н/о	н/о	3.0	н/о
6	<i>B. animalis</i> subsp.	8	6.0	6.0	2.0	3.0

<i>lactis</i> КМ МГУ №473	12	н/о	10.0	10.0	н/о
---------------------------------	----	-----	------	------	-----

*Примечание: RD – степень устойчивости (Pinto et al., 2006); «очень хорошо» - $RD \leq 5$; «хорошо» - $5 < RD \leq 10$; «приемлемо» - $10 < RD \leq 15$; «неприемлемо» - $RD > 15$; н/о – не определяли.

** Полные версии таблиц представлены в диссертации.

3.2. Устойчивость бифидобактерий к окислительному стрессу.

Устойчивость бифидобактерий к окислительному стрессу, вызванному доступом O_2 важна для применения бифидобактерий-анаэробов в качестве пробиотиков. Анализ выживаемости бифидобактерий, реактивированных из хранящихся в течение 12 мес. лиофилизированных препаратов показал, что численность клеток всех выделенных штаммов снижалась при кислородном стрессе, не более чем на 40%. По полученным результатам можно заключить, что транзиторность бифидобактерий в условиях доступа кислорода не будет нивелировать их пробиотический потенциал, что является условием эффективности заместительной терапии. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9. Выживаемость выделенных бактерий рода *Bifidobacterium* к окислительному стрессу после их реактивации из лиофилизированных препаратов.

Штамм	Время хранения (месяц)	Вариант подготовки и хранения клеток			
		-20/ -2-3 °С	-20/-20 °С	-70/-70 °С	-70/-40 °С
		Степень выживания			
<i>B.bifidum</i> КМ МГУ №468	8	65%	65%	65%	60%
	12	60%	62%	65%	60%
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	8	65%	65%	70%	65%
	12	65%	65%	65%	65%
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	8	65%	60%	65%	60%
	12	н/о	60%	65%	60%
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	8	60%	65%	65%	65%
	12	60%	65%	65%	65%
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №472	8	н/о	65%	65%	65%
	12	н/о	н/о	65%	65%

<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №473	8	н/о	60%	65%	65%
	12	н/о	60%	65%	н/о

Примечание: н/о – не определяли; 100 % - выживаемость в анаэробных условиях.

** Полная версия таблицы представлена в диссертации.

4. Определение пробиотических характеристик бифидобактерий.

При оценке пробиотических свойств МКБ особое внимание обращают на специфические продукты их метаболизма, влияющие на состав микробиома человека.

4.1. Определение продуктов брожения бифидобактерий.

У выделенных штаммов бифидобактерий определяли продукты их брожения - молочную и уксусную кислоты (табл. 10). Согласно существующим требованиям при отборе МКБ для пищевой промышленности приоритет отдается тем штаммам бифидобактерий, которые в большем количестве продуцируют молочную кислоту (de Vrese et al., 2011). Штаммы *B. bifidum* №468, *B. animalis* subsp. *lactis* №469 и 471 могут быть рекомендованы для производства пробиотических продуктов. Наибольшей продуктивностью молочной кислоты обладали *B. bifidum* №468 и *B. animalis* subsp. *lactis* №471, продуцирующие 65.2 и 53.1 мМ, соответственно.

Таблица 10. Определение молярного соотношения продуктов метаболизма бифидобактерий.

Штамм	Концентрация лактата, мМ	Концентрация ацетата, мМ	Молярное соотношение ацетат: лактат
<i>B. bifidum</i> КМ МГУ №468	65.2 ± 0.1	36.1 ± 0.1	0.6
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	45.3 ± 0.1	9.7 ± 0.1	0.2
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	17.5 ± 0.1	28.5 ± 0.1	1.6
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	53.1 ± 0.1	28.8 ± 0.1	0.5
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №472	27.8 ± 0.1	9.2 ± 0.1	0.3
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №473	12.5 ± 0.1	22.1 ± 0.1	1.8

4.2. Антибиотическая активность новых штаммов.

Антибиотические свойства новых бифидобактерий определяли в отношении ряда тест-культур (табл. 11). Штаммы *B. animalis* subsp. *lactis* №472 и 473 проявили наиболее широкую антибиотическую активность. Штамм *B. animalis* №468 более активно ингибировал рост *B. mycoides* и *S. aureus*, а штамм *B. animalis* №471 также был активен в отношении *E. coli*, что еще раз демонстрирует штаммовые различия выделенных штаммов бифидобактерий. При этом, в соответствии с литературными данными бифидобактерии не влияют на состав молочно-кислых бактерий желудочно-кишечного тракта хозяина, что является важной характеристикой пробиотиков (Бухарин и др., 2012).

Таблица 11. Влияние бифидобактерий на рост тест-культур.

Штаммы	Тест-культура						
	К	<i>B. mycoides</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>
	Диаметр зон ингибирования роста, мм						
<i>B. bifidum</i> КМ МГУ №468	0	20 ± 1	12 ± 1	16 ± 1	12 ± 1	10 ± 1	9 ± 1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	0	16 ± 1	18 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	0	0
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	0	10 ± 1	0	0	11 ± 1	0	0
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	0	16 ± 1	15 ± 1	16 ± 1	19 ± 1	12 ± 1	11 ± 1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №472	0	19 ± 1	22 ± 1	20 ± 1	15 ± 1	16 ± 1	18 ± 1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №473	0	16 ± 1	20 ± 1	17 ± 1	14 ± 1	15 ± 1	16 ± 1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №474	0	11 ± 1	11 ± 1	17 ± 1	0	0	0

К - дистиллированная вода.

4.3. Определение антибиотикорезистентности новых штаммов бифидобактерий.

Антибиотики являются основными средствами борьбы с инфекционными заболеваниями микробной природы (Landon, 2016). При этом массовое применение антибиотиков приводит к ряду тяжелых побочных эффектов, одним из которых является развивающаяся резистентность микроорганизмов к

ним. Эксперименты, проведенные на модели чувствительности бактерий *B.animalis* №469, №470, №471 к хлортетрациклину показали, что новые штаммы различались антибиотикорезистентностью (табл. 11).

Таблица 11. Оценка чувствительности новых штаммов бифидобактерий к тетрациклину (методом лунок).

Штаммы	Диаметр зоны отсутствия роста (мм) при концентрации тетрациклина (мкг/мл)					Заключение
	0 (К)	8	16	32	64	
<i>B.bifidum</i> КМ МГУ №468	0	0± 1	16± 1	21± 1	23± 1	Нечувствительная, МИС=16 мкг/мл
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №469	0	24± 1	30± 1	32± 1	34± 1	Чувствительная, МИС<8 мкг/мл
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №470	0	26± 1	28± 1	30± 1	32± 1	Чувствительная, МИС<8 мкг/мл
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №471	0	23± 1	26± 1	30± 1	32± 1	Чувствительная, МИС<8 мкг/мл
<i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №472	0	0	0	12± 1	29± 1	Нечувствительная, МИС=32 мкг/мл
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> КМ МГУ №473	0	0	0	0	0	Нечувствительная, МИС>64 мкг/мл

Тогда как штаммы *B.bifidum* №468, *B.animalis* subsp. *lactis* №472 и 473 проявили устойчивость к этому антибиотику, штаммы *B.animalis* subsp. *lactis* №469, 470 и 471 были чувствительными. Наличие или отсутствие у штамма генетических детерминант резистентности к антибиотику является важным критерием для его использования. Наличие детерминант обуславливают важность включения штамма в состав пробиотического препарата, так как его можно будет применять при антибиотикотерапии (*B.bifidum* №468, *B.animalis* subsp. *lactis* №472 и 473). При этом штаммы бифидобактерий, которые проявляют чувствительность к антибиотикам, следует рассматривать как добавки в молочнокислые продукты (*B.animalis* subsp. *lactis* №469, 470 и 471), так как при этом отсутствует опасность горизонтального переноса детерминант устойчивости и распространения антибиотикорезистентности (*B.animalis* subsp. *lactis* №469, 470 и 471).

Заключение.

Эксперименты, проведенные в рамках настоящей работы показали, что выделенные нами новые штаммы бифидобактерии обладают рядом важных пробиотических свойств: они устойчивы к желудочно-кишечному и окислительному стрессам, хорошо хранятся в лиофилизированном виде, продуцируют в достаточных количествах молочную кислоту и обладают достаточно высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных бактерий. Это позволяет рекомендовать выделенные штаммы бифидобактерий в качестве потенциальных пробиотиков, разного назначения. Предложенные нами модификации методов хранения бифидобактерий в лиофилизированном состоянии, обеспечивающие поддержание их основных пробиотических свойств (стрессоустойчивости, продуктивности биологически активных соединений, антибиотикорезистентности) могут быть рекомендованы в качестве перспективных для коллекционного хранения бифидобактерий и применения в технологии создания пробиотических препаратов. При разработке новых пробиотических препаратов приходится учитывать множество «пробиотических» свойств молочно-кислых бактерий, и часто одни штаммы опережают другие по своим качествам или набору качеств, проигрывая по другим показателям. Поэтому для выделения эффективного пробиотика приходится выбирать между многими изолятами молочно-кислых бактерий.

Выводы:

1. Из выделенных в чистые культуры и 43 штаммов предварительно идентифицированных как бифидобактерии 43 штаммов только 6 штаммов оказались представителями рода *Bifidobacterium* согласно результатам молекулярно-генетической диагностики, что делает обязательным конечным этапом идентификации бифидобактерий секвенирование гена 16S рРНК. Выделенные новые штаммы бифидобактерий помещены в коллекцию культур микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ, сиквенсы генов их 16S рРНК размещены в базе данных GenBank.
2. Разработан способ долговременного хранения бифидобактерий, с подбором криопротекторов и температурных режимов замораживания и хранения лиофилизированных клеток. Подобранные условия лиофилизации позволяют бифидобактериям сохранить основные пробиотические свойства в течение 12 мес.
3. Установлено, что выделенные новые штаммы бифидобактерий обладают штаммовой специфичностью с необходимыми пробиотическими свойствами: антагонистической активностью, подавлением роста тест-культур условно-патогенных бактерий; устойчивостью к желудочному, кишечному и окислительному стрессам; образуют большие количества молочной кислоты, что совокупно позволяет рассматривать их в качестве потенциальных культур для включения в состав пробиотических препаратов и использования в пищевой промышленности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ:

1. Харченко Н.В., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Новые подходы для выделения штаммов бифидобактерий, их молекулярная диагностика и оценка пробиотического потенциала // Микробиология. 2015. Т. 84, № 3. С.1-8.
2. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Рогожин Е.Ю., Самойленко В.А., Харченко Н.В. Структурная характеристика и защитное действие внеклеточных пептидных метаболитов *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* // Микробиология. 2015. Т.84, № 3. С.438-449.
3. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Харченко Н.В., Новикова Т.М., Чердынцева Т.А. Биологическое действие внеклеточного пептидного фактора *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* на пробиотические бактерии // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т.50, № 4. С.383-390.

Другие публикации

4. Харченко Н.В., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Биологическое действие экзометаболитов бифидобактерий на условно-патогенные штаммы // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов - 2016". Секция "Биология" (МГУ им.М.В.Ломоносова).
5. Харченко Н.В., Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Влияние внеклеточного пептидного фактора *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* на бифидобактерии // XIII международная заочно-практическая конференция "Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии". 2014. С 68-74.
6. Харченко Н.В. Биологическое действие внеклеточного фактора *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* на бифидобактерии // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов - 2014". Секция "Биология" (МГУ им.М.В.Ломоносова).
7. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Рогожина Е.А., Харченко Н.В. Действие внеклеточных пептидов *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* в защите и реактивации пробиотических бактерий // Всероссийский симпозиум с международным участием "Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов", С. 57.