

УДК 573.6.086.83:579.66

ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* ИЗ ФЕКАЛИЙ МЛАДЕНЦА ПЕРВЫХ ДНЕЙ ЖИЗНИ

А.Н. Ермолаева, У.Ж. Алгожина, О.А. Тен, Д.С. Балпанов

Филиал РГП «Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан», МОН РК,
г. Степногорск
e-mail: ipbncbrk@mail.ru

В данной статье представлены данные по выделению и изучению биохимических свойств культур рода *Bifidobacterium bifidum*. В качестве материалов для выделения культур использовались образцы фекалий младенца первых дней жизни. Образцы фекалий были получены во время пребывания детей до 7 дня жизни в стационаре. Было отобрано 10 образцов фекалий. Из желудочно-кишечного тракта младенца семи дней жизни было выделено 4 отдельных изолята. Были изучены культурально-морфологические и биохимические свойства выделенных изолятов. При микроскопировании встречались неподвижные изогнутые, булавовидные палочки, расположенные единично или собранные в цепочки. Спор не образовывали. Клетки размером 0,5 мкм. Анаэробы. Некислоустойчивые. Оптимальная температура роста 37-41°C. Хорошо росли на питательной среде *Bifidobacterium broth*. Каталазоотрицательные. Грамположительные. На основании полученных данных по изучению биохимических свойств выделенные изоляты активно усваивали широкий спектр углеводов: галактозу, глюкозу, лактозу, маннозу, сахарозу, фруктозу с образованием кислоты без газа, каталазу не образовывали. Не потребляли арабинозу, ксилозу, рамнозу, рибозу, салицин и целлобиозу. Не разжижали желатин.

Ключевые слова: *Bifidobacterium bifidum*, младенец, изоляты, штамм, фекалии, углеводы

ВВЕДЕНИЕ

Бифидобактерии являются важнейшими симбионтами желудочно-кишечного тракта человека. У детей к 3-месячному возрасту их доля в микробиоме составляет 99%, что свидетельствует о ведущей роли этой группы бактерий в становлении и развитии систем гомеостаза детского организма. Они обладают морфокинетическим действием, образуют ферменты, участвующие в метаболизме белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот, продуцируют биологически активные соединения, в частности, витамины группы В, выполняют иммуногенную и антимуtagenную функции, а также участвуют в детоксикации экзо- и эндогенных токсических агентов [1].

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

С 80-х годов прошлого века и по настоящее время исследователи отмечают дефицит бифидофлоры и снижение ее видового разнообразия у детей раннего возраста, признанных клинически здоровыми. Изменение видового состава бифидофлоры также стало характерным явлением последних двух десятилетий [2].

Период первичного становления микробиоценоза можно без преувеличения назвать базисом здоровья человека в будущем. Вместе с тем, целый ряд факторов может стать причиной возникновения дисбиотических нарушений, и их коррекция требует применения таких пробиотических средств, которые учитывали бы особенности бифидофлоры современных детей. Так, рациональный подход к конструированию и применению новых средств коррекции микрофлоры должен учитывать такое явление, как аутогенная сукцессия - последовательность смены биоценозов в определенной экологической нише. В ходе этого процесса в видовом сообществе происходит последовательное вытеснение одних видов другими вследствие их биоэкологических преимуществ в определенных условиях. В микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человеческого организма данная закономерность прослеживается в смене видового состава бифидофлоры в процессе онтогенеза [3].

Важно отметить при этом, что вмешательство неблагоприятных факторов, таких как отсутствие грудного вскармливания, эндогенные инфекции, неблагоприятная экология, могут нарушить естественный ход развития микробиоценоза ребенка.

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

производства пробиотических препаратов [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов использовались образцы фекалий младенца первых дней жизни. Образцы фекалий были получены во время пребывания детей до 7 дня жизни в стационаре. Было отобрано 10 образцов фекалий.

Выделение осуществляли методом накопительной культуры на кукурузно-лактозной среде следующего состава, г/л: пептон - 10,0; лактоза - 10,0; раствор кукурузного экстракта (1:5) - 50 мл; натрий лимоннокислый трехзамещенный - 6,0; магний сернокислый 7-водный - 0,12; калий фосфорнокислый однозамещенный - 2,0; натрий фосфорнокислый двузамещенный - 1,0; L-цистин солянокислый - 0,15 или 0,5 г аскорбиновой кислоты; агар - 1,0; вода дистиллированная - до 1 л; pH 7,0-7,2.

Культивирование осуществляли при температуре 37°C в течение 2 суток. На данной питательной среде отбирали изолированные колонии, характерные для бифидобактерий. Колонии пересевали на питательную среду *Bifidobacterium broth* следующего состава, г/л: пептический перевар животной ткани - 10,0; ферментативный гидролизат казеина - 20,0; дрожжевой экстракт - 10,0; глюкоза - 2,0; томатный порошок - 16,65; твин 80 - 2,0.

Выросшие изолированные колонии отсеивали петлей в пробирки на поверхность скошенной плотной среды и культивировали при температуре 37°C в течение 2 суток. Чистоту культур проверяли по отсутствию постороннего роста в жидкой питательной среде МПБ.

Для изучения биохимических свойств использовали среду, основной фон следующего состава, г/л: пептон - 5,0; K₂HPO₄ - 1,0; спиртовой раствор бромтимолового синего в концентрации 1,6% - 2 мл, раствор углевода в концентрации 10% (целлобиоза или фруктоза, или галактоза, или лактоза, или мальтоза, или манит, или манноза, или рафиноза, или сахароза, или трегалоза, или ксилоза, или рамноза, или арабиноза) - 10%. Культивировали при температуре 37°C в течение 96 часов. Результаты оценивали визуально по изменению окраски индикатора в составе питательной среды.

Определение каталазной активности. Часть выросших выделенных изолятов суспендировали с помощью бактериологической петли в капле 3% перекиси водорода на предметном стекле. О наличии каталазы судили по образованию пузырьков газа, наблюдаемых через 1-5 минут после внесения бактерий невооруженным глазом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из желудочно-кишечного тракта младенца семи дней жизни было выделено 4 отдельных изолята. Идентификация выделенных изолятов проводилась в соответствии с определителем бактерий Берджи [5].

Штаммы бифидобактерий - анаэробы, на поверхности плотных питательных сред в аэробных условиях не росли. При росте в полужидкой питательной среде *Bifidobacterium broth* наблюдался рост в виде гвоздикообразных характерных колоний молочного цвета, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэрибиоза). Отдельные колонии бифидобактерий имели форму мелких «гвоздей», белого цвета, образовывали при встряхивании крошковатую массу.

При микроскопировании встречались неподвижные изогнутые, булавовидные палочки, расположенные единично или собранные в цепочки (рисунки 1, 2, 3, 4). Спор не образовывали. Клетки размером 0,5 мкм. Анаэробы. Некислоустойчивые. Оптимальная температура роста 37-41°C. Хорошо росли на питательной среде *Bifidobacterium broth*. Каталазоотрицательные. Грамположительные (таблица 1).

Таблица 1. Изучение культурально-морфологических свойств выделенных изолятов из фекалия младенца

Наименование изолята	Тинкториальные свойства	Подвижность	Результаты микроскопии
<i>Bifidobacterium sp.</i>	+	-	изогнутые, булавовидные палочки, расположенные единично
<i>Bifidobacterium sp.</i>	+	-	неподвижные изогнутые палочки
<i>Bifidobacterium sp.</i>	+	-	изогнутые, булавовидные палочки с бифуркацией
<i>Bifidobacterium sp.</i>	+	-	изогнутые, булавовидные палочки с бифуркацией



Рис. 1. Микроскопирование культуры *Bifidobacterium sp. Y-1*

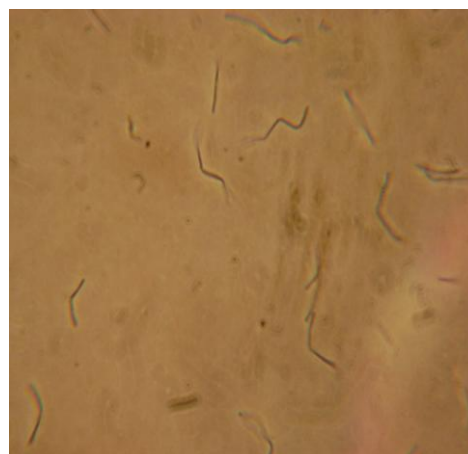


Рис. 2. Микроскопирование культуры *Bifidobacterium sp. Y-2*

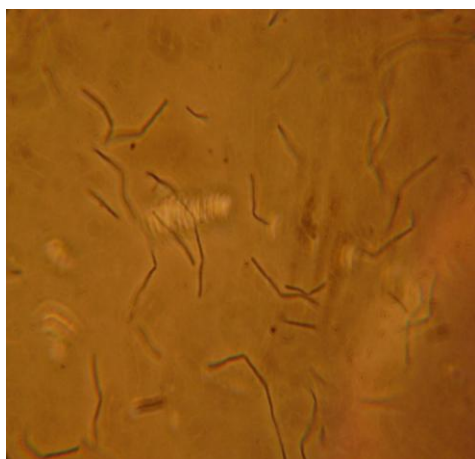


Рис. 3. Микроскопирование культуры *Bifidobacterium sp. Y-3*

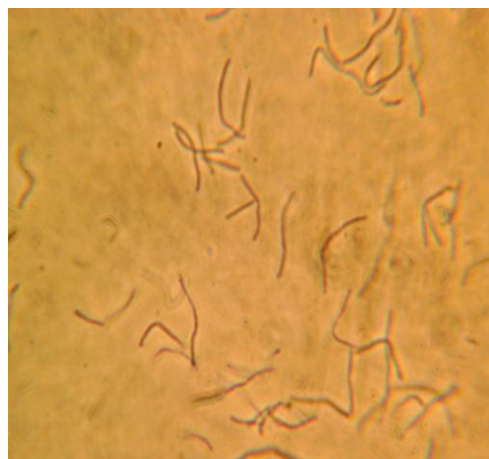


Рис. 4. Микроскопирование культуры *Bifidobacterium sp. Y-4*

В дальнейшем было проведено изучение биохимических свойств выделенных изолятов. При изучении биохимических свойств выделенных изолятов, предварительно идентифицированных как род *Bifidobacterium sp.*, была использована питательная среда основной фон.

На основании полученных данных по изучению биохимических свойств выделенные изоляты активно усваивали широкий спектр углеводов: галактозу, глюкозу, лактозу, маннозу, сахарозу, фруктозу с образованием кислоты без газа, каталазу не образовывали. Не потребляли арабинозу, ксилозу, рамнозу, рибозу, салицин и целлобиозу.

Результаты изучения биохимических свойств выделенных изолятов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Изучение биохимических свойств выделенных изолятов из фекалия младенца

Углевод	<i>Bifidobacterium sp. Y-1</i>	<i>Bifidobacterium sp. Y-2</i>	<i>Bifidobacterium sp. Y-3</i>	<i>Bifidobacterium sp. Y-4</i>
Арабиноза	-	-	-	-
Галактоза	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+
Ксилоза	-	±	-	-

Манноза	+	+	+	+
Маннит	-	-	-	-
Рамноза	-	-	-	-
Рибоза	-	-	-	-
Салицин	-	-	-	-
Сахароза	+	+	+	+
Целлобиоза	-	-	-	-
Фруктоза	+	+	+	+
Желатин	не разжижает	не разжижает	не разжижает	не разжижает
Каталазная активность	-	-	-	-
Рост при 40°C	+	+	+	+

На основании полученных данных выделенные изоляты идентифицированы как представители вида *Bifidobacterium bifidum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Феклисова Л.В. Микробиоценоз слизистых оболочек ротоглотки и кишечника у детей, посещающих детские сады // Сб. матер. междунар. конф. «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы». - М., 2004. – С. 76.
2. Alvarez-Olmos M.I., Oberhelman R.A. Probiotics agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy // *Clinical Infectious Diseases*. - 2001. - №11. - P. 1567-1576.
3. Walker R., Buckley M. Probiotic microbes: the scientific basis // A report from the American Academy of Microbiology. - Baltimore, 2005. – 22 p.
4. Алешкин В.А., Амерханова А.М. Пробиотические микроорганизмы - современное состояние вопроса и перспективы использования // *Молочная промышленность*. - 2003. - №3. - С. 59-61.
5. Хоулт Д.Ж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи. – М., 1997. – С. 58.

ТҮЙІН

Bifidobacterium bifidum түрінің пробиотикалық өсінділерінің биохимиялық қасиеттерін бөлу және зерделеу бойынша деректер ұсынылды. Пробиотикалық өсінділерді бөлу үшін материалдар ретінде өмірінің бірінші күнді сәбидің нысап үлгілері қолданылды. Нысап үлгілері сәбилердің стационарда 7 күнге дейін болған кезінде алынған. Нысаптың 10 үлгісі үріктелді. Жеті күндік сәбидің ішек-қарын жолынан 4 бөлек изолят бөлінді. Бөлінген изоляттардың өсінді-морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық қасиеттері зерделенді. Микрোকөшірмелеу кезінде қозғалмайтын имек күрзі тектес дара немесе тізбектес орналасқан таяқшалар кездесті. Спора пайда болған жоқ. Жасушалар өлшемі 0,5 мкм. Анаэробтар. Қышқыл тұрақсыз. Өсудің оптималды температурасы 37-41°C. *Bifidobacterium* broth құнарлы ортада жақсы өсті (бифидобактерия сорпасы). рН-4,5 өспеді. Каталазотеріс. Грамоң. Алынған деректер негізінде физиологиялық-биохимиялық қасиеттерді зерделеу бойынша бөлінген изоляттар көмірсулардың кең спектрін белсенді меңгерді: галактоза, глюкоза, лактоза, манноза, сахароза, фруктозаны газсыз қышқыл пайда болуымен, каталаза шорланбаған. Арабиноза, ксилоза, рамноза, рибоза, салицин және целлобиоза пайдаланбаған.

Кілтті сөздер: *Bifidobacterium bifidum*, сәби, деректер, штамм, нысап үлгілері, көмірсулар

SUMMARY

The data on the isolation and study of the biochemical properties of probiotic cultures kind of *Bifidobacterium bifidum*. As materials for the isolation of probiotic cultures baby feces samples used first days of life. Fecal samples were obtained during the stay of children up to 7 days of life in the hospital. We selected 10 samples of feces. From the gastrointestinal tract baby seven days of life have been allocated four individual isolates. We studied the cultural-morphological, physiological and biochemical properties of the isolates. When the microscope met the still curved, club-shaped rods arranged singly or gathered in the chain. The dispute did not form. Cells were 0,5 micron. Anaerobes. Acid-fast. The optimum growth temperature is 37-41°C. Grew well on the medium *Bifidobacterium* broth (bouillon for bifidobacteria). Did not grow at pH 4,5. Catalase. Gram. Based on the data from the study of physiological and biochemical properties isolates active assimilate a wide variety of carbohydrates: galactose,

glucose, lactose, mannose, sucrose, fructose, to form a free acid gas catalase did not form. Do not consume arabinose, xylose, rhamnose, ribose, salicin and cellobiose.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, kind, isolates, штамм, feces samples, carbohydrates