

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Динова Регина Камилевна

СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *VIFIDOBACTERIUM SPP. C*
ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ
ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор

Т.В. Маркушева

Научный консультант:

А.В. Цветкова

Уфа-2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----|
| Список сокращений и условных обозначений | 3 |
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 6 |
| 1.1. Бактерии рода <i>Bifidobacterium</i> | 6 |
| 1.2. Пробиотики на основе <i>Bifidobacterium spp.</i> | 15 |
| 1.3. Бактериофаги | 23 |
| 1.4. Практическое применение бактериофагов | 27 |
| 1.5. Пиобактериофаги | 32 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 36 |
| 2.1. Взятие материала | 36 |
| 2.2. Пиобактериофаг | 37 |
| 2.3. Питательные среды | 37 |
| 2.4. Посев бактерий в жидкую и плотную среды | 40 |
| 2.5. Создание анаэробных условий | 42 |
| 2.6. Окраска по Граму | 43 |
| 2.7. Определение антагонистической активности методом перпендикулярных штрихов | 44 |
| 2.8. Титрование фага методом агаровых слоев | 45 |
| 2.9. Выделение ДНК | 46 |
| 2.10. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени | 48 |
| 2.11. Ранговая статистика | 50 |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ | 52 |
| 3.1. Активность бактериофага по отношению к чистой культуре | 52 |
| 3.2. Активность бактериофага в клиническом материале | 61 |
| 3.3. Получение антагонистически активных штаммов | 71 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 89 |
| ВЫВОДЫ | 90 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 91 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ | 101 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

БОЕ – бляшкообразующие единицы

ВКО – внутренний контрольный образец

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДа – единица измерения молекулярной массы

КОЕ – колониобразующие единицы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПК – положительный контроль

ОКО – отрицательный контрольный образец

УПМ – условно-патогенный микроорганизм

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

В настоящее время для профилактики и лечения дисбактериоза желудочно-кишечного тракта широко применяются пробиотики (Червинец Ю.В. и др., 2016). Наиболее перспективными среди них являются бактерии рода *Bifidobacterium*, которые обладают высокой биологической и функциональной активностью. В этой связи они используются на практике как в качестве пробиотиков, так и в производстве пищевых продуктов (Chen C.C., Walker W.A., 2005). Биологическая активность пробиотиков может снижаться, поэтому периодически встает необходимость их проверки и поиска новых штаммов-кандидатов в пробиотики. Важное значение для селекции перспективных пробиотиков имеет экспериментальная оценка их антагонистической активности с помощью бактериофагов.

В наше время фаги применяются в качестве диагностических препаратов для установления рода и вида бактерий, а также в качестве селективных агентов.

В связи с недостаточной оснащенностью лабораторий выращивание *Bifidobacterium spp.* под питательной средой затруднено, что не дает возможность идентифицировать этот микроорганизм до вида.

Одним из наиболее надежных способов идентификации штаммов *Bifidobacterium* можно считать полимеразную цепную реакцию.

Цель исследования

Получение при использовании бактериофагов аутоштаммов *Bifidobacterium spp.* с выраженной антагонистической активностью для создания новых пробиотических препаратов, направленных на коррекцию и поддержание микробиоценоза кишечника.

Задачи исследования

1. Получение чистой культуры штамма *Bifidobacterium*
2. Приготовление десятикратных разведений клинического материала для определения исходной концентрации бактерий рода *Bifidobacterium*.
3. Посев клинического материала для получения накопительной культуры.
4. Титрование фага методом агаровых слоев.
5. Выделение изолированных колоний *Bifidobacterium spp.* и проведение их анализа методом ПЦР с помощью родоспецифичных и видоспецифичных праймеров.
6. Определение антагонистической активности *Bifidobacterium spp.* и условно-патогенных микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов.

Научная новизна

Разработана методика выделения клинических культур бактерий рода *Bifidobacterium* на питательной среде с Пиобактериофагом, который обеспечивает селективные свойства питательной среды. Сформирована коллекция из 5 штаммов *Bifidobacterium spp.*, выделенных из клинического материала; 3 из которых обладают высокой антагонистической активностью.

Практическая значимость

Из кишечника здоровых людей выделены и исследованы штаммы рода *Bifidobacterium*, которые могут быть использованы в качестве основы для создания новых пробиотических препаратов и коррекции дисбиотических нарушений микрофлоры.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бактерии рода *Bifidobacterium*

Род *Bifidobacterium* относится к типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*, подклассу *Actinobacteridae*, порядку *Bifidobacteriales*, семейству *Bifidobacteriaceae*. Ближайшими родственниками бифидобактерий являются виды *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia* и *Scardovia* (Garrity et al., 2007).

Впервые описал *Bifidobacterium* spp. Тисьер примерно в 1900 году (Roupard et al., 1973). Он выделил из фекалий вскормленного грудью младенца культуру анаэробных бактерий, клетки которых обладали специфической Y-образной морфологией. Тисьер дал им название *Bacillus bifidus*. В 1917 году Винслоу с сотрудниками предложил создать семейство *Lactobacillaceae* (Winslow et al., 1917), а тремя годами позже Холланд назвал штамм, выделенный Тисьером *Lactobacillus bifidus* (Holland, 1920). В 1924-ом году Орла-Йенсен отнёс род *Bifidobacterium* к отдельному таксону (Orla Jensen, 1924; Prasanna et al., 2014). В 1957-м году Денерт впервые обнаружил существование множества биотипов внутри рода *Bifidobacterium* и предложил систему дифференцировки пяти групп этих бактерий, которая была основана на характере сбраживания ими углеводов (Dehnert, 1957). На основании биохимических и серологических характеристик, вдобавок к уже известной на тот период *B. bifidum*, Реутер в 1963-м году выделил ещё семь видов бактерий, относящихся к роду *Bifidobacterium*, и предложил схему их идентификации. В роде *Bifidobacterium* Реутер выделял следующие виды: *B. bifidum* var. *a* и *b*; *B. infantis*; *B. parvulorum* var. *a* и *b*; *B. breve* var. *a* и *b*; *B. liberorum*; *B. lactentis*; *B. adolescentis* var. *a*, *b*, *c* и *d*; *B. longum* var. *a* и *b* (Reuter, 1963). В 1969-м году Митсуока предложил иную схему классификации бифидобактерий. По ней, во-первых, к виду *B. longum* были добавлены два новых биотипа (*B. longum* subsp. *animalis a* и *b*), а во-вторых,

к уже известному разнообразию бактерий рода *Bifidobacterium* было добавлено два новых вида (*B. thermophilum* и *B. pseudolongum*), выделенных из фекалий животных (Mitsuoka, 1969). В том же году Скардови с сотрудниками выделили из рубца крупного рогатого скота *B. ruminale* (впоследствии оказалось, что этот вид идентичен *B. thermophilum*) и *B. globosum* (Scardovi et al., 1969). Тогда же Скардови и Трователли выделили из кишечника медоносных пчёл три новых вида (*B. asteroides*, *B. indicum* и *B. coryneforme*) с морфологией отличной от уже известных представителей этого рода (Scardovi, Trovatelli, 1969). Благодаря использованию молекулярных методов, а именно анализу сиквенсов 16S рибосомальной РНК/ДНК, удалось грамотно классифицировать представителей рода *Bifidobacterium* (Ventura et al., 2007; Downes et al., 2010). Род *Bifidobacterium* также как *Gardnerella* (типовой и единственный вид – *Gardnerella vaginalis* (Greenwood, Pickett, 1980) были включены в одно семейство *Bifidobacteriaceae*, которое отнесли к порядку *Bifidobacteriales* в подклассе *Actinobacteridae* в классе *Actinobacteria* в отделе *Firmicutes* в домене *Bacteria*. Позднее в семейство *Bifidobacteriaceae* были включены ещё пять новых родов: *Aeriscardovia* (единственный вид 34 *Aeriscardovia aeriphila*, ранее известен как «*Bifidobacterium aerophilum*» (Simpson, 2004), *Alloscardovia* (типовой и единственный вид – *Alloscardovia omnicoles* (Huys et al., 2007), *Metascardovia* (типовой и единственный вид – *Metascardovia criceti* (Okamoto et al., 2007; Anderson et al., 2013), *Parascardovia* (типовой и единственный вид – *Parascardovia denticolens* (Jian, Dong, 2002), ранее известен как «*Bifidobacterium denticolens*» (Milani et al., 2013) и *Scardovia* (на сегодняшний день известно к этому роду относятся два вида: типовой вид – *Scardovia inopinata*, ранее известен как «*Bifidobacterium inopinatum*», и *Scardovia wiggsiae* (Downes et al., 2010).

Bifidobacterium spp. – это род грамположительных полиморфных палочек, ветвящихся на концах; могут существовать в виде отдельных клеток или формируют цепочки и кластеры; неспорообразующие и

неподвижные; анаэробные и хемоорганотрофные; способны превращать углеводы в молочную кислоту. По их отношению к кислороду, бактерии рода *Bifidobacterium* можно разбить на группы: гиперчувствительные к O₂, чувствительные к O₂, толерантные к O₂ и микроаэрофильные (Felis and Dellaglio, 2007).

Большинство видов ферментирует маннит, лактозу, глюкозу, сахарозу с образованием уксусной и молочной кислот.

Хорошо растут на мясопептонных и сахарных средах, нуждаются во внесении в среду витаминов; лучше растут на печеночном отваре с добавлением лактозы.

Преобладает в толстой кишке. В норме количество *Bifidobacterium spp.* у грудных детей составляет 10⁹ – 10¹⁰ КОЕ/г фекалий, у взрослых и детей старшего возраста – 10⁸ – 10⁹ КОЕ/г. Бактерии рода *Bifidobacterium spp.* – представители вагинальной микрофлоры в количестве 10⁶ КОЕ/мл. (Воробьев А.А., 2006).

Бактерии рода *Bifidobacterium spp.* вырабатывают витамины группы В и антибиотические субстанции, подавляющие рост условно-патогенных микроорганизмов. Другой механизм подавления условно-патогенной микрофлоры обусловлен их способностью связывать рецепторные структуры эпителиальных клеток (с ними взаимодействует большинство бактерий). (Поздеев О.К., 2001).

Bifidobacterium spp. разрушают и предотвращают накопление в кишечнике вредных продуктов обмена других микроорганизмов – индола, скатола, фенолов, а также биогенных аминов, обладающих канцерогенным действием. Детоксицирующую активность кишечных бактерий исследователи приравнивают к деятельности печени (Biavati V. et al., 2006).

Форму клеток бактерий из рода *Bifidobacterium* обычно описывают как плеоморфную. Плеоморфизм меняется в зависимости от вида. Некоторые виды представлены большим разнообразием клеточных форм, в то время как другие показывают гомогенную морфологию клеток. Их размер

составляет $0.5-1,3 \times 1.5-8$ мкм² (Салгтнова, 2014). Они могут располагаться поодиночке, в парах, образовывать фигуры V-образной формы. В зависимости от условий культивирования, клетки *Bifidobacterium spp.* демонстрируют значительный плеоморфизм. Было показано, что избыток в среде для культивирования N ацетилглюкозамина, аланина, глутаминовой кислоты, серина и ионов кальция влияет на форму клеток бактерий рода *Bifidobacterium* (Nebra et al., 1999; Tharmaraj et al., 2003). На плотных питательных средах *Bifidobacterium spp.* образуют разнообразные по форме и цвету колонии: плоские, полушаровидные, блестящие, шероховатые, окруженные валиком, имеющие более темный центр, от белого и серого до темно-коричневого. Размеры колоний составляют от 0.5 до 5.0 мм (Домотенко и др., 2014).

Температурный оптимум культивирования *Bifidobacterium spp.* составляет 37-41 °C (Egan et al., 2014). Не отмечается роста при температуре ниже 20 °C и выше 46 °C с единственным исключением – *B.thermacidophilum*, который способен расти при 47°C (Uelivon et al., 2007). Также некоторые отличия отмечают в зависимости от источника выделения штамма. Большинство штаммов «животного», но не «человеческого» происхождения обладают, способностью расти при столь высокой температуре (Uelivon et al., 2007). Было также показано, что *B.longum* при тепловых стрессах выделяют малый белок теплового шока (SHSP). Показана выживаемость у *B.longum* NCC2705 при 55 °C в течение 30 и 60 мин (Khaskheli et al., 2015).

Bifidobacterium spp. – это анаэробы (Barret et al., 2013). Однако некоторые штаммы обладают свойством аэротолерантности, например, *B. psychraerophilum*, *B. lactis* (Simpson et al., 2004). Аэротолерантность некоторых штаммов бифидобактерий можно объяснить наличием слабой каталазной активности или действием НАДН-оксидазы (Oberг et al., 2013). У штаммов с высокой чувствительностью к кислороду именно накопление перекиси водорода является губительным фактором, так как она 35

инактивирует ключевой фермент углеводного метаболизма бактерий рода *Bifidobacterium*– фруктозо-6-фосфат-фосфокетолазу (Ф6ФФК; Zhihong et al., 2015). Другие штаммы не накапливают перекиси водорода, так как для роста они нуждаются в низком окислительно-восстановительном потенциале (ОВП). Продукты брожения могут привести к торможению роста *Bifidobacterium spp.* из-за установления повышенного для выполнения жизненно-важных функций значения ОВП. До сих пор было проведено очень мало исследований, направленных на изучение взаимосвязи чувствительности к кислороду и кислородного метаболизма у бактерий рода *Bifidobacterium*. Однако уже показано, что восстановленная НАДН-пероксидаза и супероксиддисмутаза играют роль в защите от токсического действия кислорода у штаммов *B. breve*, *B. infantis* и *B. longum* (Talwalkal et al., 2004). Очевидно, что даже внутри группы столь близкородственных микроорганизмов важнейшая причина непереносимости кислорода может отличаться для разных штаммов.

Bifidobacterium spp. сбраживают гексозы исключительно через фруктозо- 6-фосфатный путь (Scardovi, Trovatelli, 1965; Yazawa et al., 1978). Ключевым ферментом бактерий рода *Bifidobacterium* при этом является тиаминдифосфат-зависимая фосфокетолаза. Этот фермент также служит важным таксономическим признаком при идентификации *Bifidobacterium spp.* до рода, но не даёт возможности определить различия на видовом уровне.

У бактерий рода *Bifidobacterium* описана двусубстратная фосфокетолаза: Ф6ФФК (xfr). Ген, кодирующий Ф6ФФК был впервые идентифицирован и охарактеризован на хромосоме *Bifidobacterium lactis* (Meile et al., 2001). Гексозы переходят во фруктозо-6-фосфат, который под действием фосфокетолазы расщепляется на эритрозо-4-фосфат и ацетилфосфат. Далее за счет работы трансальдолазы седугептулозо- + глицеральдегид- 4-фосфат 3-фосфат рибозо- + ксилулозо- 5-фосфат 3-фосфат глицеральдегид-3-фосфат пируват лактат ацетат эритрозо-4-фосфат

ацетилфосфат глюкоза глюкозо-6-фосфат фруктозо-6-фосфат АТФ фруктозо-6-фосфат ацетилфосфат 2АТФ 37 и транскетолазы эритрозо-4-фосфат и фруктозо-6-фосфат превращаются в 2 моля пентозофосфата. На следующем этапе вновь вступает в действие фосфокетолаза, которая расщепляет ксилулозо-5-фосфат на ацетилфосфат и глицеральдегид-3-фосфат. Глицеральдегид-3-фосфат под действием глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы превращается в пируват, который может быть восстановлен до лактата или расщепляться с образованием ацетата, а ацетилфосфат превращается в ацетат под действием ацетаткиназы- А с синтезом АТФ. Молочная и уксусная кислоты являются основными продуктами гексозного метаболизма (Roupard et al., 1973). Однако состав, количество и соотношение конечных продуктов метаболизма может варьировать в широких пределах в зависимости от условий культивирования бифидобактерий (Klijn et al., 2005; Ruas-Madiedo et al., 2005; Sanchez et al., 2007). У *Bifidobacterium spp.* сахароза катаболизируется с помощью фермента сахарозо-фосфорилазы (ScrP) с образованием глюкозо-1-фосфата и фруктозы. Глюкозо-6-фосфат-изомераза преобразует глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат, который поступает в F6PPK-шунт. Экспрессия этих трёх генов регулируется на уровне транскрипции. Другой ключевой фермент углеводного метаболизма, который был описан у бактерий рода *Bifidobacterium*, это β - галактозидаза (Zarate, Lopez-Leiva, 1990). Гидролитическую активность данного фермента применяют в пищевой индустрии для уменьшения содержания лактозы в молоке, а трансгликозилирующая активность, в результате которой образуются галакто-олигосахариды, изучена в гораздо меньшей степени (Van Laere et al., 2000).

Поскольку известно, что при длительном хранении *Bifidobacterium spp.* клетки утрачивают свою способность дальнейшего роста, а также теряются пробиотические свойства, то весьма актуальными становятся вопросы, связанные с возможностью эффективного способа хранения в

специализированных коллекциях, производственных и научно-исследовательских организациях. Некоторые штаммы *Bifidobacterium spp.* могут нести коммерческий интерес, так как в дальнейшем их могут использовать в пробиотических препаратах. Одним из основных критериев применения того или иного способа хранения клеток является адекватный выбор условий хранения, обеспечивающих длительное сохранение клетками своих свойств и максимального уровня жизнеспособности. Известно несколько различных способов, позволяющих сохранять клетки бактерий рода *Bifidobacterium* в жизнеспособном и репродуктивном состоянии (поддержание клеток на жидких и агаризованных средах, хранение в иммобилизованном виде, лиофилизация и криоконсервация с использованием защитных сред и криопротекторов (Marsalek et al., 1988; Сидякина и др., 1991; Chen et al., 2003; Poncet, 2003) Метод непродолжительного хранения является одним из самых простых, но требующих постоянного контроля роста, затрат на посуду, среды и рабочую силу. При субкультивировании на свежие агаризованные среды необходим подбор сред, температуры хранения и режим пересевов. С использованием минерального масла можно продлить время хранения для ряда культур. Для данного способа хранения культуры выращивают в пробирках, а далее стерильно наливают слой минерального масла высотой не менее 2 см. В данном случае слой масла является защитой культуры от высыхания, одновременно с этим понижается метаболизм. В некоторых случаях используют физиологический раствор и дистиллированную воду. Клетки с плотностью не более 10^9 КОЕ/мл вносят в пробирку. Пробирки с инокулятом хранят при температуре 4-8 °С. Хорошим методом хранения для многих микроорганизмов является хранение на твердых носителях. В качестве носителей используют почву, песок, бумагу, смолу, желатин, активированный уголь, зерна злаков. Для хранения используют метод замораживания при температуре ниже точки кристаллизации воды. Клетки в водно-солевом растворе помещают в холодильники с температурным

режимом от минус 10 до минус 20 °С, данный метод не рекомендуют использовать для криочувствительных бактерий.

Методы длительного хранения. При использовании криоконсервации происходит переход биологического объекта в состояние холодового анабиоза с последующим возвратом их к метаболической активности. Известно, что при глубоком замораживании биологических объектов могут происходить серьезные, в том числе и необратимые повреждения клеток за счет повреждений, вызываемых формированием кристаллов льда как внутри, так и снаружи клеток, сопровождающихся их обезвоживанием и нарушением свойств клеточных мембран (Day, 2007). Вследствии обезвоживания локальное содержание солей в клетке достигает критической концентрации, оказывая негативное воздействие на структуру белка. Изучали влияние режимов охлаждения и состава сред криоконсервации на жизнеспособность и пролиферативные свойства производственного штамма *B. bifidum* (Грачева и др., 2011). Образцы замораживали со скоростью охлаждения 1,5, 10 и 15 град/мин до -40 °С с последующим погружением в жидкий азот и непосредственным погружением криопробактерий в жидкий азот (-196 °С). Показано, что замораживание *Bifidobacterium spp.* со скоростью 1 град/мин обеспечивает сохранность клеток на исходном уровне. Однако, далее культуры необходимо хранить в жидком азоте. Быстрое охлаждение минимизирует эффект концентрации электролитов вне клетки, так как образование льда протекает равномерно, но приведет к образованию большого его внутриклеточного количества. Медленное охлаждение (от -30 до -80 °С) наоборот приводит к большой потере воды из клетки и к меньшему накоплению внутриклеточного льда, но при этом эффект концентрирования электролитов вне клетки значительно повышается. И тот, и другой режимы замораживания для эффективной криоконсервации клеток предполагают применение и внесение в суспензию клеток защитных агентов, которые, как правило, влияют на эластичность цитоплазматической мембраны,

связывают внутриклеточную воду и предотвращают чрезмерное обезвоживание клеток, снижают токсическое воздействие солей электролитов и препятствуют образованию крупных кристаллов льда в клетке или в непосредственной близости от клетки (Сидоренко, 2009). Известны способы двухстадийного замораживания, согласно которому суспензию клеток замораживают до 50 °С, а далее помещают в пары жидкого азота с температурой -170 °С (Мамедова, 2015). Основным недостатком данной методики является: недостаточная выживаемость клеток в результате замораживания-оттаивания клеток, необходимость применения сложной аппаратуры для программируемого замораживания суспензии клеток. Также при хранении образцов в жидком азоте существует необходимость его периодически добавлять в емкость для хранения клеток из-за его испарения, что приводит, таким образом, к дополнительным экономическим затратам. Другим способом хранения является лиофильное высушивание клеток из замороженного состояния. Это широко-распространенный способ высушивания биоматериалов из замороженного состояния, при котором вода испаряется в условиях вакуума без оттаивания льда, что позволяет полностью сохранять первичную структуру объекта. Некоторые культуры при использовании данного метода способны сохранять в жизнеспособном состоянии до 30-50 лет и более (Полихенко и др., 2009; Куплетская и Нетрусов). При этом необходимо чтобы культуры были защищены от действия кислорода, влаги и света. Успех лиофилизации зависит от качества используемых клеток, от того насколько они жизнеспособны и в каких условиях выросли (Uzunova - Doneva, 2004). Выращивают достаточно большое количество клеток так, чтобы в суспензии содержалось не менее 10^8 клеток/мл. Их собирают в период максимальной стабильности и жизнеспособности культуры (ранняя стационарная фаза роста). Для подготовки клеток к лиофилизации их суспендируют в среде, содержащей растворы защитных сред. Американская коллекция типовых культур использует в качестве криопротекторов либо 20

% молоко, либо 12 % раствор сахарозы. Также есть работы по выделению из культуральной жидкости *L. casei* пептидного реактивирующего фактора, который обладал протекторными свойствами в отношении бифидобактерий. Данный реактивирующий фактор представляет собой комплекс, в состав которого входят две активные фракции пептидов (1.8 и 2.4 кДа соответственно), содержащих гликозидные связи (Воробьева, 2014; Воробьева и др., 2015). По данным аминокислотного анализа, в их структуре присутствуют остатки Gly, Leu, Pro, Arg и Asn/Asp, и отсутствуют остатки серосодержащего Cys; также было показано, что реактивирующий фактор не имеет пространственной модификации по типу образования дисульфидных мостиков. Использование реактивирующего фактора является перспективным направлением для сохранности клеток *Bifidobacterium spp.* при замораживании и последующей лиофилизации.

1.2. Пробиотики на основе бифидобактерий

Пробиотики – это микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения положительное влияние на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина за счет стабилизации и оптимизации функции микробиоценоза кишечника.

Действие пробиотиков основано не только на коррекции микрофлоры, но и на иммуномодулирующей активности и участии в обмене веществ. Препараты и пробиотические продукты назначают также при внекишечной патологии: ОРВИ, инфекционном мононуклеозе, atopическом дерматите, при вторичном иммунодефиците, при подготовке к вакцинации, для оптимизации физического развития.

Пробиотики и пробиотические продукты используют в следующих случаях:

- лечение заболеваний, связанных с изменением микрофлоры (острые кишечные инфекции (ОКИ) у детей и взрослых, кольпиты у женщин);
- коррекция дисбактериоза кишечника у детей и взрослых или бактериального вагиноза (дисбактериоза влагалища) у женщин;
- регуляция обменных процессов в организме путем повышения активности метаболизма кишечной флоры и собственных обменных процессов пробиотических бактерий при колонизации кишечника;
- оказание позитивного влияния на местный и системный иммунитет,
- повышение противoinфекционной защиты, иммуномодулирующее действие (Корочинский А.В., 2014).

К пробиотическим производственным штаммам предъявляются следующие требования:

1. Предлагаемый штамм должен быть идентифицирован до вида по фено- и генотипическим признакам. При устойчивости штамма к антибиотикам она должна быть обусловлена хромосомной природой.
2. Штамм должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными свойствами без признаков диссоциации.
3. Штамм должен быть однороден по физиолого-биохимическим свойствам, охарактеризованным с помощью регламентированных методов или с использованием зарегистрированных тест-систем.
4. Штамм не должен продуцировать ферменты, относящиеся к факторам патогенности.
5. Штамм должен обладать антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям. Зона угнетения роста тест- культур должна быть более 10 мм.
6. Штамм не должен обладать высокими адгезивными свойствами.
7. Штамм не должен быть чувствительным к воздействию желудочного сока, щелочи, желчи.

В РФ зарегистрированы следующие препараты-пробиотики на основе бактерий рода *Bifidobacterium* (таблица 1).

Таблица 1 – Зарегистрированные в РФ препараты-пробиотики на основе бактерий рода *Bifidobacterium*:

| | |
|---------------------------------|--|
| Классические монокомпонентные | Бифидумбактерин (<i>B. bifidum</i> с добавлением бифидогенного фактора — лактозы, различные лекарственные формы). |
| Поликомпонентные | Бификол (<i>B. bifidum</i> и <i>E.coli M-17</i>), Бифиформ® (<i>B. longum</i> и <i>Enterococcus faecium</i>), |
| Комбинированные и сорбированные | Бифилиз (<i>B. bifidum</i> и лизоцим), Бифидумбактерин форте (<i>B.bifidum</i> адсорбированные на активированном угле), Пробифор — лиофильно высушенная микробная масса живых бактерий антагонистически активного штамма <i>B. bifidum</i> № 1 в дозе 10 ⁸ КОЕ, иммобилизованных на частицах косточкового активированного измельченного угля с добавлением лактозы. |

Лечебные свойства сорбированных пробиотиков обусловлены заселением кишечника *Bifidobacterium spp.*, которые в иммобилизованном состоянии обеспечивают плотную локальную колонизацию слизистой оболочки и, тем самым, быстрее восстанавливают нормофлору и репаративный процесс в слизистой оболочке кишечника. Существенно, что эта группа пробиотиков может использоваться в комплексе с антибиотиками, гормонами, нестероидными противовоспалительными препаратами.

Среди известных пробиотических микроорганизмов *Bifidobacterium spp.* являются одними из самых доминирующих групп, и некоторые виды

Bifidobacterium spp. часто используются в качестве пробиотического ингредиента во многих функциональных продуктах питания.

Взаимоотношения микробиоты с макроорганизмом представляют собой решающий фактор в развитии и поддержании физиологии и иммунной системы человека.

Пробиотики, в частности бактерии рода *Bifidobacterium*, используются в составе ферментированных продуктов питания и считаются безопасными в применении. Известно, что применяемые *per os* пробиотики могут привести к развитию взаимовыгодного симбиоза с микрофлорой ЖКТ и активации иммунной системы путем выработки провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин (IL) -12, или IL-6, а также противовоспалительных цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста β (TGF) и IL-10.

Биологически активные пептиды, выделяемые *Bifidobacterium infantis*, сохраняют свою биологическую активность *in vivo* и являются эффективными в нормализации проницаемости кишечника, что способствует восстановлению его функции на модели мышей с колитом [J.V. Ewaschuk et al., 2008]. Эффект воздействия пептидов опосредуется путем уменьшения уровня провоспалительных цитокинов и улучшения экспрессии плотных белков-переходников. Биологически активные субстанции, выделенные из *Bifidobacterium spp.*, можно применять в клинической практике для увеличения сопротивления и поддержания кишечного барьера. А. Имаока с соавторами обнаружил противовоспалительный эффект *Bifidobacterium spp.* у людей с неспецифическим язвенным колитом (А. Имаока et al., 2008). При совместном культивировании периферических мононуклеарных клеток крови от людей с эрозивным колитом и двумя штаммами бактерий рода *Bifidobacterium Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium bifidum* выявлено, что пробиотические бактерии увеличивают продукцию IL-10 и подавляют секрецию IL-8. *Bifidobacterium bifidum* BGN4 способен контролировать

развитие синдрома раздраженного кишечника путем подавления продукции цитокинов, таких как гамма-интерферона и моноцитарного хемоатрактантного протеина Т-клетками (N. Kim et al., 2007). В подавлении роста опухоли мочевого пузыря (ОМП) Wei Tang с соавторами успешно использовал генетический метод лечения с помощью новых *Bifidobacterium infantis* (BI). Противоопухолевой активностью обладает система BI-ОМП, вызывающая апоптоз опухолевых клеток. Апоптоз, запрограммированная смерть клетки, относится к определенным физиологическим или патологическим состояниям, в которых завершение клеточной жизнеспособности регулируется путем активации множества факторов апоптоза. В нормальных клетках два процесса, апоптоз и пролиферация, сосуществуют и поддерживают динамическое равновесие. Когда ген уничтожения системы BI-ОМП был доставлен в опухоль крыс, обнаружено, что система может существенно тормозить рост опухоли мочевого пузыря крыс, индуцируя апоптоз в опухолевых клетках (W. Tang et al., 2009). Чтобы преодолеть трудности, которые препятствуют широкому применению специальной системы доставки в генной терапии рака и подавлению роста рака печени, использован штамм *Bifidobacterium longum* в качестве системы для транспортировки гена, контролирующего эндостатин, который может подавлять рост опухолей. Штамм *B. longum* с геном эндостатина (*B. bacterium longum* -En) вводился орально мышам с опухолью. Результаты показали, что *B. bacterium longum* -En может сильно тормозить рост опухоли печени у мышей и продлить их срок жизни. Кроме того, рост опухоли подавляется более эффективно, если лечение включало комбинацию *B. longum* -En и селена. Обогащение *Bifidobacterium longum* -En селеном улучшает деятельность НК клеток и Т-клеток и стимулирует активность ИЛ-2 и ФНО- α у мышей. Таким образом, *B. longum* -En может быть очень эффективным вектором для транспортировки противоопухолевых генов в генной терапии рака (F. Geng-Feng et al., 2005).

Несмотря на указанное в литературе позитивное влияние *Bifidobacterium spp.*, остается не изученным их противовирусный эффект в отношении клеток рака шейки матки. Большинство случаев рака шейки матки связаны с инфекционным процессом в аногенитальной области, вызванным вирусом папилломы человека (ВПЧ). Min-Kyeong Cha (С. Min-Kyeong et al., 2012) показала, что *Bifidobacterium adolescentis* SPM1005-А проявил противовирусную активность путем подавления экспрессии онкогенов Е6 и Е7. Процесс канцерогенеза рака шейки матки связан с избыточной экспрессией вирусных онкогенных белков Е6 и Е7, которые инактивируют действие супрессоров опухолевого роста, р53 и рRb, блокируют апоптоз, сокращают теломеры и снижают иммунное распознавание (С.В. Woodman et al., 2001). Предпринимались попытки подавить эти два гена, характерных для вируса папилломы человека высокого риска 16 и 18 типа. G. L. Li с соавторами показал, что онкогенный механизм регуляции, активирующий факторы опухолевых супрессоров и индуцирующий апоптоз, может быть использован в раковых клетках шейки матки (G.L. Li et al., 2010). М. Ives с соавторами выявил способность бактерий рода *Bifidobacterium* уменьшать инфекционный процесс, вызванный вирусом везикулярного стоматита путем продукции провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 и гамма-интерферон (М. Ives et al., 2007). Эти эффекты коррелируют с митохондриальной активностью инфекционных макрофагов, таким образом, измерение активности митохондриальных дегидрогеназ может являться первым показателем потенциального ингибирующего эффекта *Bifidobacterium spp.* на репликацию вируса. Выявлена способность штамма *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, выделенного из испражнений детей, ингибировать репликацию *in vitro* ротавируса, а также защищать клетки, МА-104 и НТ-29, от проникновения в них вируса (J.A. Moreno Muñoz et al., 2011). Кроме того, данное свойство *Bifidobacterium spp.* подтверждено *in vivo* на модели мышей. Этот новый штамм обладал свойствами,

характерными для пробиотических бактерий, такими как резистентность к желчным солям, NaCl, низкому pH, а также адгезией к слизистой оболочке кишечника и чувствительность к антибиотикам (Ya-Ni Yin et al., 2010).

В производстве молочных продуктов нередко используют бактерий рода *Bifidobacterium*. Так, Li Haiping с соавторами в соевое молоко добавлял культуру из шести пробиотических штаммов, в том числе *B. animalis ssp.lactis V9* и *B. animalis Bb12*, и оценивал их характеристики брожения (L. Haiping et al., 2012). Показано, что шесть пробиотических штаммов могут хорошо расти в этой среде и увеличивать содержание биологически активных веществ в соевом молоке, в том числе γ -аминомасляной кислоты, витамина B6, и общих изофлавоидных агликонов, и могут быть использованы в качестве потенциальных стартеров для соевого молока. Некоторые виды *Bifidobacterium spp.* предотвращают развитие инфекционного процесса, вызванного патогенными бактериями, такими как *Escherichia coli*, *Salmonella* и *H. pylori* (A.M. Silva et al., 2004; K.Y. Wang et al., 2004). Abdelmajid Zouhir с соавторами установил, что штаммы *Bifidobacterium spp.* RBL 68 и RBL 85, выделенные из испражнений новорожденных, продуцируют две бактериоциноподобные субстанции, подавляющие грамположительные и грамотрицательные бактерии (A. Zouhir et al., 2011). Эти белковоподобные субстанции проявили свою активность по отношению к возбудителям, вызывающим порчу продуктов, таких как *Listeria monocytogenes*. Это делает *Bifidobacterium spp.* потенциально полезными в пищевой промышленности. Методом диффузии в агар показано ингибирующее воздействие *Bifidobacterium spp.*, *B. thermophilum*, *B. bifidum*, *B. longum* и *B. infantis*, за счет их антимикробных субстанций по отношению к патогенным бактериям, особенно штаммам *Listeria monocytogenes*. Ингибирующие эффекты оставались стабильными после термообработки при 100 °C в течение 5 мин, но снижались после использования ферментов проназы-Е и протеиназы-К. Некоторые из изученных *Bifidobacterium spp.* оказались толерантными к действию

перекиси водорода (100-200 мкг/мл), желчных солей (0,3%), лизоцима (0,5 мг/мл), способными переносить низкие значения pH и выживать при ее критических значениях (pH=2) (A. Zinedine et al., 2007). Продуцирующие бактериоцины штаммы микроорганизмов, в частности молочнокислые бактерии, или сами бактериоцины могут быть использованы как природные консерванты пищевых продуктов (Беляева Е.А., 2014).

Проводятся работы по инженерии дизайна пробиотиков как средств доставки лекарств (В.М. Лахтин и др., 2008), осуществляется стратегия рецепторной мимикрии для создания пробиотиков узнавания мишеней — специфических патогенов и токсинов для усиления иммунного ответа (Culligan E.P., Hill C., Sleator R.D., 2009).

Собственные штаммы бактерий (аутоштаммы или аутокультуры), выделенные из кишечника отдельного человека или влагалищного отделяемого женщины и размноженные в производственных условиях, приживаются у данного индивида с эффективностью до 100% и могут за короткое время полностью восстановить микробиоценоз. Для ускорения лечения дисбактериозов кишечника и бактериального вагиноза используется введение аутоштаммов (аутокультур) бактерий рода *Bifidobacterium*. Даже кратковременный курс введения аутоштаммов (аутокультур) *Bifidobacterium spp.* способствует быстрому и эффективному восстановлению микрофлоры кишечника и влагалища при дисбактериозе.

Для получения аутоштаммов (аутокультур) необходимо выделить чистые культуры бактерий рода *Bifidobacterium* из клинического материала (фекалий) в селективной питательной среде. Общим недостатком является то, что используемые на данный момент питательные среды совершенно не обладают способностью подавлять рост сопутствующей бактериальной флоры. При посеве в среду клинического материала (фекалий) и культивировании посевов при 37°C происходит обильное размножение сопутствующей аэробной и факультативно-анаэробной микрофлоры, что приводит к угнетению роста бактерий рода *Bifidobacterium*, делает

невозможным накопление их в питательной среде, а при высеве со среды накопления на плотную селективную питательную среду колонии бактерий рода *Bifidobacterium* не вырастают.

1.3. Бактериофаги

Бактериофаги (с древнегреч. – «пожирающие бактерии»), или просто фаги, – это вирусы, способные поражать бактерии.

Бактериофаги различаются по форме и строению. Некоторые из них имеют очень простую форму – икосаэдра или нити. У одних фагов наследственная генетическая информация зашифрована в ДНК (одно- или двуцепочечной), у других – в РНК. Наиболее сложно организованы фаги с большим (обычно до 170 тыс. пар нуклеотидов) геномом. Такие фаги и по размеру могут быть крупнее вирусов многоклеточных животных. Типичный бактериофаг состоит из головки, в которой содержится ДНК или РНК, окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой (капсидом), и хвоста белковой трубки, которая используется для инъекции вирусного генетического материала в бактериальную клетку.

Бактериофаги, как и другие вирусы, состоят из нуклеиновой кислоты и белка. Общее количество белка в частице фага составляет 50–60%, нуклеиновых кислот – 40–50%. В химическом составе некоторых фагов обнаружены ДНК с необычными азотистыми основаниями. У фага T2 вместо цитозина содержится 5-оксиметилцитозин, внутри головки фага обнаружен белок, в состав которого входят полиамины (спермин, путресцин). Этот белок играет определенную роль в суперспирализации фаговой ДНК, что способствует ее размещению в сравнительно небольшой головке. В частицах многих фагов под чехлом дистальной части отростка содержится фермент лизоцим.

Фаги более устойчивы к действию физических и химических факторов окружающей среды, чем многие вирусы человека. Большинство

из них инактивируются при температуре свыше 65–70 °С, хорошо переносят замораживание и длительно сохраняются при низких температурах и высушивании. Сулема (0,5 % раствор), фенол (1,0 % раствор) не оказывают на них инактивирующего действия. В то же время, 1,0 % раствор формалина инактивирует фаговые частицы в течение нескольких минут. Выявлена резистентность бактериофагов к воздействиям ионизирующей радиации и УФ-излучения.

По характеру взаимодействия с микробной клеткой различают вирулентные и умеренные бактериофаги.

В отличие от умеренных бактериофагов, литические фаги убивают бактериальную клетку сразу после ее инфицирования (Тикунова Н.В.; Власов В.В., 2013).

Бактериофаг может развиваться по двум моделям: лизогенный и литический путь.

Умеренные и вирулентные бактериофаги на начальных этапах взаимодействия с бактериальной клеткой имеют одинаковый цикл развития. Вирулентные бактериофаги развиваются по литической модели, которая включает следующие стадии:

- 1) Адсорбция бактериофага на фагоспецифических рецепторах клетки. Адсорбция фагов на клеточной поверхности бактерий происходит при помощи специфических рецепторов, которые располагаются на кончике нити, шипа или хвостика. В свою очередь, на клеточной стенке бактерии располагаются ее фагоспецифические рецепторы, распознаваемые фагом. Рецепторы для одних фагов находятся в липопротеидном слое клеточной стенки, для других – в липополисахаридном слое. Для ряда фагов рецепторы находятся на жгутиках или пиях. Адсорбция фага – пусковой момент его жизненного цикла. Она очень специфична и поэтому обуславливает возможность практического использования фагов, например, для идентификации бактерий, а также для лечебных и профилактических целей. Пластинка с шипами прикрепляется к стенке, содержащийся в них лизоцим

вызывает в месте контакта лизис клеточной стенки. Одновременно ионы кальция активируют содержащуюся в белках чехла АТФ-азу, и чехол сокращается. Его длина уменьшается в 2 раза, количество витков также уменьшается в 2 раза. В результате сокращения чехла внутренний стержень прокалывает клеточную стенку в участке, разрушенном лизоцимом, и цитоплазматическую мембрану.

2) Инъекция фаговой нуклеиновой кислоты в клетку хозяина. Внедрение фаговой ДНК в клетку происходит с помощью следующим образом: около 10 % ее активно впрыскивается во время сокращения чехла хвоста; остальная часть фаговой ДНК втягивается в цитоплазму бактерий благодаря процессам транскрипции и работе трансляционного аппарата. Белки капсида остаются снаружи клеточной стенки.

3) Совместная репликация фаговой и бактериальной нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота фага направляет синтез ферментов фага, используя для этого белоксинтезирующий аппарат бактерии. Фаг тем или иным способом инактивирует ДНК и РНК хозяина, а ферменты фага совсем расщепляют её; РНК фага «подчиняет» себе клеточный аппарат синтеза белка. Репликация фаговой геномной ДНК или РНК протекает в соответствии с общим механизмом репликации. Степень зависимости репликации ДНК фага от хромосомы клетки определяется набором генов у фагов. Крупные фаги (фаг Т4), осуществляют репликацию полностью автономно; средние – частично нуждаются в помощи бактериальных генов, а мелкие (фаг М13) почти полностью зависят от хромосомных генов. После начала репликации начинается синтез поздних вирусных 14 информационных РНК. В результате образуется второй набор вирус-специфических белков, в том числе субъединицы вирусного капсида.

4) Сборка вновь синтезированных вирионов – заключение фаговой нуклеиновой кислоты в белковую оболочку (морфогенез фагов). У мелких фагов морфогенез протекает по типу самосборки. У фага Т4 этот процесс требует активности более 40 генов и происходит при участии трех

самостоятельных линий. На одной происходит сборка хвоста (участие 20 генов), на другой – головки фага (около 16 генов), на третьей – сборка ворсин (5 генов). Соединение хвоста с головкой не требует участия генов, но оно не может произойти до тех пор, пока и хвостовой отросток, и головка не будут смонтированы полностью. Точно так и ворсины могут присоединиться к хвосту только после его полного соединения с головкой. Благодаря строгому генетическому контролю со стороны фага обеспечивается последовательность и согласованность всех процессов его внутриклеточного размножения.

5) Лизис клетки. Клетка лопается под воздействием лизоцима; высвобождается около 200–1000 новых фаговых частиц; фаги инфицируют другие бактерии. Выход вновь синтезированных фагов из клетки происходит:

1) путем почкования (M13 – единственный фаг, не вызывающий при выходе из клетки ее гибели);

2) путем лизиса клетки изнутри. Осуществляется лизоцимом и вызывает гибель клетки.

Лизоцим синтезируется как поздний вирус-специфический белок. Он воздействует на пептидогликановый слой стенки бактериальной клетки, в результате стенка разрывается, фаговое потомство выходит из клетки. Иногда происходит лизис бактерий извне, как следствие адсорбции многих фагов на одной клетке, но при этом размножения фагов не происходит. Обычно же после внедрения фагового генома в клетку у нее возникает состояние иммунитета к суперинфекции данным фагом, т.е. проникновение других фаговых геномов становится невозможным [Иконникова Н.В., 2017].

Бактериофаги обитают в почве (в 1 г – около 10^8 фагов), в реках, озерах и океанах (в 1 мл морской воды – 10^6 фагов), в других живых организмах (в желудочно-кишечном тракте человека – около 10^{12} фагов). Общая же численность бактериофагов, по оценке ученых, достигает

астрономической цифры – 10^{31} фагов или 10^9 т вещества (Тикунова Н.В.; Власов В.В., 2013).

1.4. Практическое применение бактериофагов

В связи с катастрофически возрастающей антибиотикорезистентностью и отсутствием в ближайшей перспективе новых антибактериальных средств возродился активный интерес к фаготерапии.

Научные данные последних десятилетий доказывают, что в отличие от антибиотиков препараты бактериофагов имеют следующие положительные качества:

1) размножаясь, они самостоятельно регулируют свою численность (увеличивая или уменьшая ее), поскольку размножаются только до тех пор, пока имеются чувствительные бактерии, а затем постепенно элиминируются из организма и окружающей среды;

2) они гораздо более специфичны, чем большинство антибиотиков; будучи нацелены на конкретные проблемные бактерии, вызывают гораздо меньшее повреждение нормального микробного баланса организма. Бактериальный дисбаланс, или «дисбиоз», вызванный лечением многими антибиотиками, может привести к серьезным вторичным инфекциям с участием достаточно резистентных бактерий, увеличивающим затраты на лечение и летальность. Специфические проблемы, возникающие в результате, включают инфекции, вызванные псевдомонадами, трудно поддающиеся лечению, и *Clostridium difficile*, причину серьезной диареи и псевдомембранозного колита;

3) фаги имеют возможность использовать в качестве мишеней рецепторы на бактериальной поверхности, участвующие в патогенезе, а это означает, что вирулентность любых резистентных к ним мутантов ослаблена;

4) в отношении фаговой терапии описано мало побочных эффектов;
5) фаговая терапия была бы особенно применима для лиц с аллергией к антибиотикам;

б) должным образом селекционированные фаги можно легко использовать профилактически, способствуя предотвращению бактериальных заболеваний у людей или животных при контакте с микробами, либо для санации больниц и борьбы с госпитальными инфекциями;

7) фаг можно использовать либо независимо, либо в сочетании с другими антибиотиками, с целью уменьшения вероятности развития резистентности бактерий;

8) фаги не воздействуют на нормофлору кишечника и препараты эубиотиков и протобиотиков, что дает возможность для их совместного применения.

Обладая широким спектром антибактериальной активности и клинической эффективности, бактериофаги эффективны против лекарственно-устойчивых организмов, что предоставляет возможность расценивать их как аналоги или заменители антибиотиков и средства противосептической терапии.

Фаготерапия может использоваться профилактически с целью борьбы с распространением инфекционного заболевания там, где источник идентифицирован на ранней стадии, или там, где вспышки случаются внутри сравнительно закрытых организаций, таких как школы или детские сады [И.М. Щербенков, 2013].

В Отраслевом Стандарте «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ Минздрава РФ № 231) внимание врачей было ориентировано на профилактику и терапию дисбиотических состояний с помощью пробиотиков у взрослых и применение пробиотических препаратов и специфических лечебных бактериофагов у детей. Высокая специфичность к целевым

микроорганизмам и совместимость бактериофагов с другими лекарственными средствами при терапии кишечных, респираторных и урогенитальных инфекций у детей и взрослых определили своеобразный бум к разработке новых препаратов лечебных бактериофагов (Бондаренко В.М., 2011). Широко обсуждаются вопросы по созданию отечественной коллекции бактериофагов (Зурабов А.Ю., Каркищенко Н.Н., Попов Д.В. и др., 2012). Получены обнадеживающие данные о возможности деконтаминации с помощью специфических фагов продуктов питания (Алешкин А.В., Караулов А.В., Светоч Э.А. и др., 2013). Описаны бактериофаги, избирательно лизирующие бактериальные клетки *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus faecalis*, недавно поименованные в коллективной монографии Каттер Э. и Сулаквелидзе А. «Бактериофаги, биология и практическое применение» (Каттер Э., Сулаквелидзе А., 2012).

Следует отметить, что лечебные бактериофаги, активные в отношении многочисленных возбудителей гнойно-воспалительных процессов, вызывающих респираторных кишечные и урогенитальные инфекции, известны с начала XX века (Каттер Э., Сулаквелидзе А., 2012; Карабелеш Е.Е., Ткаченко С.А., Панкратов С.М. и др., 2008; Красильников И.В., Лобастова А.К., Лыско К.А., 2010). Было показано, что в ходе диффузии фаговых вирионов в слизистую оболочку, тканевую жидкость, лимфу или кровь в результате контакта с бактериальными клетками происходит адсорбция (прикрепление) фагов к поверхности возбудителя. После возникновения устойчивой связи между специфическим рецепторным участком и вирионом адсорбция фага становится необратимой. Фаговая ДНК или РНК поступает в цитоплазму бактериальной клетки, вызывает блокирование синтеза ее белков и после репликации и сборки зрелых вирионов наступает лизис клеточной стенки изнутри с выходом 60-70 вирионов во внешнюю среду. Система фаголизиса базируется на наступающем в определенный специфический момент времени

последовательном ферментативном гидролизе цитоплазматической мембраны. Гидрофобный мембранный белок-холин обеспечивает за счет разрушения цитоплазматической мембраны доступ второго фермента к клеточной стенке, который связан с фаг-ассоциированным лизином (Крылов В.Н., 2001; Young R., 1992). Циклы репродукции специфических бактериофагов с их накоплением в месте локализации воспалительного процесса являются важной особенностью фаготерапии, отличающей ее от применения этиотропных химиотерапевтических средств, обладающих широким антимикробным спектром и часто затрагивающих нормальную микрофлору организма хозяина (Бондаренко В.М., 2011; Каттер Э., Сулаквелидзе А., 2012; Красильников И.В., Лобастова А.К., Лыско К.А., 2010).

В настоящее время ведущую роль в этиологии гнойно-воспалительных процессов играют полиантибиотикорезистентные штаммы условно-патогенных бактерий различных таксономических групп. Известно снижение эффекта этиотропной терапии из-за формирования устойчивости к лекарственным препаратам штаммов возбудителей. Более того, применение антибиотиков сопровождается нарушениями нормальной микрофлоры, что может вести к формированию иммунодефицитных состояний и аллергизации организма. Альтернативой антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам являются лечебные бактериофаги с широким спектром антимикробной активности, подавляющие как чувствительные, так и антибиотикоустойчивые бактерии. Для подавления антибиотикоустойчивых форм условнопатогенных бактерий рекомендовано использовать комплексные бактериофаги с высокой специфической литической активностью, способные элиминировать возбудителей гнойно-воспалительных процессов различной локализации (S., Rashel M., Uchiyama J. et al., 2005; Sulakvelidze A., Alavidze Z., Vorris J.G., 2001; Ворошилова Н.Н., Боговазова Г.Г., Казакова Т.Б. и др., 2000; Thacker PD., 2003).

Диапазон способов применения лечебных бактериофагов необычайно широк и включает не только аппликации на месте поражения, но и пероральный, интравагинальный, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный способы введения. Эффективно также применение препаратов лечебных бактериофагов в виде клизм, аэрозолей, введение в полость легких, в перикард и т.д. В середине XX века отсутствовал контроль качества производственных препаратов, что приводило к использованию бактериофагов в случайных концентрациях и часто с неизвестным составом. В связи с этим период первоначального подъема интереса к фаготерапии сменился столь же значительным охлаждением. Этому способствовала не только малая изученность и эмпирические способы фаготерапии, но и неизвестные в то время особенности взаимодействия бактериофага с микробной клеткой, что в сумме выглядело как трудно прогнозируемые результаты лечения (Бондаренко В.М., 2013).

Фаги перспективны против патогенов, например, вызывающих урогенитальные патологии (S. Letkiewicz et al., 2010). Фаготерапия возможна и в условиях сформированных биопленок патогенов. Эффективность фагов обусловлена проникновением в глубокие слои биопленок с помощью, кодируемых фагами деполимераз (Azeredo J., Sutherland I.W., 2008). Нашло также применение фага, кодирующего полисахарид - лиазу, для обработки биопленок *P. aeruginosa* (Azeredo J., Sutherland I.W., 2008). Литические фаги рассматриваются как новый класс антибиопленочных агентов (Donlan R.M., 2009). К преимуществам использования фаготерапии относятся: а) селективное устранение патогена без существенного нарушения прочего микробного пейзажа в организме; б) альтернативное заместительное или синергидное применение в сочетании с прочими антимикробными агентами. Многие умеренные фаги лактобацилл и других МКБ индуцируются простыми способами, что позволяет получать их в препаративных количествах (S.-M. Deutsch et al., 2004).

Препараты бактериофагов выпускают в виде таблеток, мазей, аэрозолей, свечей и суспензий. Традиционной формой выпуска является жидкий препарат. Употребляют препараты для орошения полостей, смазывания раневых поверхностей, вводя перорально, внутривенно и т.п. Широкое применение нашли следующие лечебно-профилактические культуры бактериофагов: стафилококковый, стрептококковый, дизентерийный, брюшнотифозный, сальмонеллезный, колифаг, протейный, синегнойный; для снижения частоты бактериальных осложнений у больных используется также Пиобактериофаг; имеются комбинированные препараты, используемые при кишечных инфекциях, инфекциях стрептококковой и стафилококковой этиологии, ожогах и травмах, осложненных гнойным воспалением и др. (Иконникова Н.В., 2017).

1.5. Пиобактериофаги

Пиобактериофаг поливалентный очищенный применяется для лечения и профилактики различных форм гнойно-воспалительных и энтеральных заболеваний. Также его используют при:

1. заболеваниях желудочно-кишечного тракта (гастроэнтероколит, холецистит, панкреатит, дисбактериоз кишечника);
2. воспалительных заболеваниях новорожденных и детей раннего возраста (гастроэнтероколит, дисбактериоз кишечника, омфалит, пемфигус, пиодермия, септицемия и септикопиемия различной локализации);
3. хирургических инфекциях (нагноения ран, гнойные поражения кожи, ожоги, перитонит, плеврит, мастит, остеомиелит);
4. урогенитальных инфекций (цистит, пиелонефрит, эндометрит, вульвит, бартолинит, кольпит, сальпингоофорит);
5. гнойно-воспалительных заболеваний уха, горла, носа, пазух носа, ротовой полости, глотки, гортани, легких и плевры (отит, ангина, фарингит, стоматит, пародонтит, гайморит, фронтит, пневмония, плеврит);

6. посттравматических конъюнктивитах, кератоконъюнктивитах, гнойной язве роговицы и иридоциклитах;

7. профилактике внутрибольничных инфекций, вызванных бактериями *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

Важным условием эффективной фаготерапии является предварительное определение фагочувствительности возбудителя.

Препарат используют для приема внутрь (через рот), в виде клизм, аппликаций, орошений, введения в полости ран, вагины, матки, носа, пазух носа, а также в дренированные полости: абсцессов, брюшную, плевральную, мочевого пузыря, почечной лоханки. Внутрь препарат принимают натощак за 0,5–1 час до приема пищи.

Лечение гнойно-воспалительных заболеваний с локализованными поражениями должно проводиться одновременно как местно, так и приемом препарата внутрь.

В случае обработки полости гнойного очага химическими антисептиками перед применением бактериофага она должна быть промыта стерильным 0,9% раствором натрия хлорида.

При лечении ангины, фарингита, ларингита препарат используют для полосканий полости рта и глотки 3 раза в день по 10–20 мл, курс лечения 7–10 дней.

При лечении бронхита, пневмонии препарат принимают внутрь 3 раза в день по 10–20 мл, а также применяют в виде аэрозолей и ингаляций (без подогрева и использования ультразвука), курс лечения 15–20 дней.

При лечении отита препарат используют для промывания и введения в полость среднего уха по 2–5 мл 1–3 раза в день. Курс лечения 7–15 дней.

При лечении воспаления пазух носа препарат используют для промывания полости носа, носоглотки и пазух носа в дозе 5–10 мл и введения в пазухи 2–3 мл. Процедуру повторяют ежедневно однократно в течение 7–10 дней. Кроме того, препарат вводят в полость носа в виде

турунд, смоченных бактериофагом, по очереди в каждый носовой ход и оставляют в течение 0,5–1 часа. Процедуру повторяют 3 раза в день, курс лечения 7 — 15 дней.

При лечении стоматита и хронического пародонтита препарат используют в виде полосканий полости рта 3–4 раза в день в дозе 10–20 мл, а также введением в пародонтальные карманы турунд, пропитанных бактериофагом, на 5–10 мин, курс лечения 7–10 дней.

При конъюнктивите и кератоконъюнктивите препарат применяют по 2–3 капли 4 — 5 раз в день, курс лечения 5–7 дней; при гнойной язве роговицы — по 4–5 капель в день в течение 7–10 дней, при гнойном иридоциклите — по 6–8 капель каждые 3 часа в сочетании с приемом внутрь в терапевтических дозировках в течение 7–10 дней.

При абсцессе после вскрытия и удаления гнойного содержимого препарат вводят в количестве меньшем, чем объем удаленного гноя ежедневно однократно, курс лечения 7 — 10 дней.

При перитоните и плеврите препарат вводят в дренированные полости — брюшную и плевральную через дренажные трубки ежедневно однократно 20–70 мл, курс лечения 10 — 15 дней.

При остеомиелите препарат вводят в полость раны через турунды, дренажи в количестве 10–30 мл ежедневно однократно, курс лечения 15–20 дней.

При лечении мастита, нагноений ран и ожогов, препарат применяют в виде орошения, аппликаций, повязок, введения в дренаж в дозе 5–50 мл в зависимости от очага поражения не менее 1 раз в день, курс лечения 10–15 дней.

При лечении гнойно-воспалительных гинекологических заболеваний (нагноений ран, эндометрита, вульвита, бартолинита, кольпита, сальпингоофорита) препарат используют для орошений, аппликаций, вводят в полости ран, вагины, матки по 5–20 мл один раз в день в течение 7–10 дней.

При цистите, пиелонефрите, уретрите препарат принимают внутрь в терапевтической дозе 3 раза в день за 1 час до еды в течение 10–20 дней. В том случае, если полость мочевого пузыря или почечной лоханки дренированы, препарат вводят через цистостому или нефростому 1–3 раза в день по 20–50 мл в мочевой пузырь и 5–7 мл в почечную лоханку, курс лечения 7–15 дней.

При гастроэнтероколите, панкреатите, холецистите, а также дисбактериозе кишечника бактериофаг принимают внутрь в возрастных дозировках 3 раза в день за 1 час до еды в течение 7–15 дней (по клиническим показаниям). При неукротимой рвоте препарат применяют в виде высоких клизм 2–3 раза в день по 20–40 мл. При дисбактериозе кишечника препарат может применяться с препаратами нормофлоры.

Для профилактики внутрибольничных хирургических инфекций препарат используют для обработки послеоперационных и свежеинфицированных ран в дозе 5 — 50 мл в зависимости от очага поражения ежедневно однократно в течение 5–7 дней (Бактериофаги, эл. ресурс, 2005).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Взятие материала

Материалом для исследования служили образцы содержимого кишечника практически здоровых людей.

Материал собирали до начала лечения антибактериальными и химиотерапевтическими препаратами. Для исследования собирали свежесвыделенный кал. За 3 - 4 дня до исследования отменили приём слабительных препаратов, касторового и вазелинового масла и прекратили введение ректальных свечей. Кал, полученный после клизмы, а также после приёма бария (при рентгеновском обследовании) для исследования непригоден. Кал собирали после самопроизвольной дефекации в чистый, одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой и ложечкой в количестве не более 1/3 объёма контейнера (следить, чтобы не попала моча). Подкладное судно предварительно обрабатывали любым дезинфицирующим средством, тщательно промывали проточной водой несколько раз и ополаскивали кипятком. Материал доставляли в лабораторию в течение 3 часов с момента сбора анализа. Желательно в течение указанного времени материал хранить в холоде (для этого можно использовать хладопакет или обложить контейнер кубиками льда, приготовленными заранее). На контейнере необходимо указать фамилию, инициалы, дату рождения, дату и время сбора материала, запись должна быть сделана разборчивым почерком. При взятии материала необходимо соблюдать стерильность. По возможности сбор материала на исследование должен осуществляться до назначения антибиотиков (если невозможно, то не ранее, чем через 12 часов после отмены препарата).

При микроскопии на предметное стекло нанесли 1-2 капли дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия и растирали в ней с помощью стеклянной палочки небольшой комочек кала до получения равномерной суспензии и покрывали покровным стеклом.

2.2. Пиобактериофаг

Препарат «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, филиала г. Уфы представляет собой смесь очищенных фильтратов фаголизатов бактерий *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

2.3. Питательные среды

Жидкая питательная среда для выделения и культивирования *Bifidobacterium spp.* «Бифидум-среда» (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск).

Способ приготовления: 50,0 г среды тщательно размешали в 1 л воды дистиллированной, кипятили в течение 1 мин, периодически перемешивая, до полного расплавления агара. Профильтровали через ватно-марлевый фильтр, разлили по 9,0 мл в пробирки и стерилизовали автоклавированием при температуре 112 °С в течении 30 мин. Стерильную среду можно хранить не более 7 суток при температуре (2-8) °С, перед использованием регенерировать путем нагревания ее в кипящей водяной бане в течение 15-20 мин. рН 6,7 - 7,3

Готовая к употреблению питательная среда прозрачная, желтого или желтовато-коричневого цвета.

Состав, г/л:

| | |
|------------------------------------|------|
| Панкреатический гидролизат казеина | 30,0 |
| Экстракт пекарных дрожжей | 5,0 |
| Глюкоза | 7,5 |
| Лактоза | 2,5 |
| Цистеин | 0,5 |

| | |
|----------------------|-----|
| Натрий хлористый | 2,5 |
| Магний серноокислый | 0,5 |
| Кислота аскорбиновая | 0,5 |
| Натрий уксуснокислый | 0,3 |
| Агар | 0,9 |

Бифидум-среду необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30°C.

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой «ГРМ-бульон» (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск) предназначен для культивирования различных микроорганизмов, неприхотливых по своим питательным потребностям, таких как энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки, а также для проведения исследований в санитарной и клинической микробиологии. «ГРМ-бульон» представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-желтого цвета. Культивирование микроорганизмов в жидкой питательной среде осуществляется микробиологическим методом. Принцип метода — визуальное обнаружение роста культур, выделенных из исследуемых образцов, по помутнению среды.

Приготовление: 20,0 г порошка размешали в 1 л дистиллированной воды, кипятили в течение 3 мин, фильтровали через бумажный фильтр, разливали по 5,0 мл в стерильные пробирки и стерилизовали автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Готовая к употреблению питательная среда должна быть прозрачная, желтого цвета.

СОСТАВ

ГРМ-бульон представляет собой смесь сухих компонентов из расчета, г/л:

Вариант 1.

Панкреатический гидролизат рыбной муки 18,0

Натрия хлорид 2,0

Вариант 2.

Панкреатический гидролизат рыбной муки 8,0

Пептон сухой ферментативный 8,0

Натрия хлорид 4,0

Готовую среду можно использовать в течение 1 месяца при условии хранения ее при температуре 2-8 °С.

Плотная неселективная питательная среда для культивирования микроорганизмов «ГРМ-агар» (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г.Оболенск).

«ГРМ-агар» предназначен для культивирования различных микроорганизмов, таких как: энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки, а также для проведения исследований в санитарной и клинической микробиологии. «ГРМ-агар» представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-желтого цвета.

Культивирование микроорганизмов на плотной питательной среде осуществляем микробиологическим методом. Принцип метода — визуальное обнаружение роста культур в виде соответствующих колоний на поверхности плотной питательной среды.

Для получения достоверных результатов посеvy образцов производили не менее, чем в трех повторностях. Определение проводили визуально.

Способ приготовления: 38,0 г среды тщательно размешали в 1 л воды дистиллированной, кипятили в течение 2 мин, периодически перемешивая, до полного расплавления агара. Профильтровали через ватно-марлевый фильтр, стерилизовали автоклавированием при температуре 112 °С в течении 15 мин. Среду охладили до температуры 45-50 °С. Разлили в стерильные чашки Петри слоем 5-6 мм. После застывания среды чашки подсушили при температуре 37±1°С в течение 40-60 мин. рН 7,1 - 7,5.

СОСТАВ

ГРМ-агар представляет собой смесь сухих компонентов из расчета, г/л:

Вариант 1.

Панкреатический гидролизат рыбной муки 24,0

Натрия хлорид 4,0

Агар микробиологический 10,0±2,0

Вариант 2.

Панкреатический гидролизат рыбной муки 12,0

Пептон сухой ферментативный 12,0

Натрия хлорид 6,0

Агар микробиологический 10,0±2,0

Готовую среду можно использовать в течение 1 месяца при условии хранения ее при температуре 2-8°C.

Питательная среда для выделения энтеробактерий «Эндо агар» (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск).

Способ приготовления: 36,0 г среды размешали в 1 л дистиллированной воды, кипятили в течение 2-3 мин до полного расплавления агара, фильтровали через ватно-марлевый фильтр, снова довели до кипения, охладили до температуры 45-50°C. Разлили в стерильные чашки Петри слоем 5-6 мм. После застывания среды чашки подсушили при температуре 37±1 °С в течение 40-60 мин. Готовую среду необходимо использовать в день приготовления.

2.4. Посев бактерий в жидкую и плотную среды

Методика посева бактерий в жидкую питательную среду. В левую руку берут две пробирки. В одной находится питательная среда (плотное или жидкое), в другой – исследуемый материал. Пробирки зажимают

большим и указательным пальцами. Для того, чтобы можно было наблюдать за содержанием пробирок, их держат сверху кисти руки. Пробирки должны быть кое-что наклоненными, и нужно следить, чтобы при открытии их материал или посторонние микробы из окружающих предметов из одной не попали в другую. Пробки из пробирок вынимают, держа их 4 и 5 пальцами правой руки. Тремя другими пальцами правой руки, как карандаш, держат бактериологическую петлю или пипетку, которыми распределяют исследуемый материал.

Сначала стерилизуют петлю в верхней части пламени газовой горелки. Пробирки открывают и край их проносят через пламя горелки. Петлю опускают в пробирку, где есть исследуемый материал, и, осторожно касаясь стенки, охлаждают. В последующем петлю опускают в пробирку и набирают материал. Если он находится в жидком состоянии, для посева достаточно капли жидкости, которая задерживается в кильке бактериологической петли. Когда используют микробов, которые выросли на поверхности среды, осторожно плавным движением набирают небольшое количество их, следя, чтобы не повредить питательную среду. Петлю медленно вынимают из пробирки, не касаясь ее стенок, и переносят в другую пробирку со средой. Штриховыми движениями от одной стенки пробирки к другой, начиная с нижней части среды, проводят занял материалу по скошенной поверхности агара снизу кверху. Петлю вынимают из пробирки, пробки и края пробирок проносят через пламя и закрывают. Петлю прожаривают в пламени, чтобы уничтожить микроорганизмы.

При посеве материала на жидкую питательную среду петлю с материалом окунают в жидкость. Если он не снимается из петли, его осторожно растирают на стенке пробирки и омывают средой. Материал, который набирали пастеровской или градуированной пипеткой, выливают в питательную среду, а для равномерного распространения его пробирку осторожно, чтобы не замочить пробку, стряхивают или вращают, зажав в ладонях.

Методика посева в плотную питательную среду. Различают несколько способов:

Посев в пробирку. Материал, забранный петлей, опускают до дна пробирки со скошенным агаром, погружают в конденсационную жидкость и зигзагообразными движениями петли проводят снизу вверх, слегка касаясь поверхности среды (посев штрихом). При посеве материала уколом в столбик среды, петлей с материалом или иглой прокалывают вертикально центру пробирки питательную среду, петлю или иглу вынимают, прожигают. (Правила работы с пробирками и петлей при посеве в пробирку с плотной средой аналогичны правилам при посеве на жидкие питательные среды).

Посев на чашку Петри. Чашку берут в левую руку, большим пальцем левой руки слегка приподнимают крышку, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходила петля или шпатель, обжигают на пламени горелки края чашки в зоне щели, вносят посевной материал на поверхность питательной среды, затем растирают его при помощи стеклянного шпателя или бактериологической петли.

2.5. Создание анаэробных условий

Культивирование анаэробных организмов более сложно, чем выращивание аэробов, так как здесь должен быть сведен к минимуму контакт с кислородом. Для создания анаэробных условий используют различные методы. Один из них - эвакуационно заместительный метод.

Эвакуационно заместительный метод заключается в использовании анаэроустатов. Они представляют собой герметические металлические или пластмассовые банки, из которых можно выкачать кислород и заменить его инертным газом (гелий, азот, аргон). Допускается использование трехкомпонентной газовой смеси, которая состоит из 80 % азота, 10 % диоксида углерода и 10 % водорода. Порой допустимым считается

использование природного газа. Для поглощения кислорода, который остается в анаэроостате, используют палладиевые катализаторы. С целью поглощения водяной пары используют хлорид кальция, силикагель и тому подобное, которые помещают на дно анаэроостата.

2.6. Окраска по Граму

Окраска по Граму относится к сложному способу окраски. При сложных способах окраски на мазок воздействуют двумя красителями, из которых один является основным, а другой – дополнительным. Кроме красящих веществ, при сложных способах окраски применяют различные обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты и т.д. Особенностью окраски по Граму является неодинаковое отношение различных микроорганизмов к красителям трифенилметановой группы: генциановому, метиловому или кристаллическому фиолетовому. Микроорганизмы, входящие в группу грамположительных (Грамм+), например стафилококки, стрептококки, дают прочное соединение с указанными красителями и йодом. Окрашенные микроорганизмы не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином Грамм(+) микроорганизмы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. Грамотрицательные (Грамм–) микроорганизмы (бактероиды, фузобактерии и др.) образуют с генциановым кристаллическим или метиловым фиолетовым и йодом легко разрушающееся под действием спирта соединение, в результате чего они обесцвечиваются и затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет. Отношение микроорганизмов к окрашиванию по Граму имеет большое диагностическое значение.

Методика окраски:

1. Фиксированный мазок окрашивают через фильтровальную бумагу основным красителем – раствором основного карболового кристаллического фиолетового. Окрашивание длится 1-2 минуты.

2. Снимают бумагу, сливают избыток красителя и, не промывая препарата водой, наливают раствор Люголя на 1-2 минуты до почернения препарата.

3. Раствор Люголя сливают. Предметное стекло для обесцвечивания мазка погружают несколько раз в стаканчик со спиртом, процесс обесцвечивания считается завершенным, когда от мазка перестают отделяться окрашенные в фиолетовый цвет струйки жидкости.

4. Препарат тщательно промывают водопроводной водой.

5. Докрашивают спирто-водным раствором фуксина в течение 1-2 минут. Результаты окраски Грам(+) микроорганизмы окрашиваются основным красителем в темно-фиолетовый цвет, Грам(-), принимая дополнительную окраску, приобретают ярко-малиновый цвет.

2.7. Определение антагонистической активности методом перпендикулярных штрихов

При определении антагонистической активности штамма основной принцип заключается в создании условий для совместного культивирования антагонистов на агаризованных или в жидких питательных средах.

При использовании метода перпендикулярных штрихов на поверхность агаризованной среды в чашке Петри засевают штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антибактериальное вещество. Посев делали по диаметру чашки, которую затем помещали в термостат при температуре, оптимальной для роста. Продолжительность культивирования определяли скоростью роста антагониста. После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду, перпендикулярно к выросшему штриху, подсевают штрихами тест-культуры, начиная от краев чашки. Чашки поместили в термостат на 48 часов. Если изучаемый микроорганизм-антагонист образует диффундирующее в среду вещество, оказывающее антимикробное действие

в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем более чувствительна тест-культура к продуцируемому антибиотическому веществу. Нечувствительные микроорганизмы будут развиваться в непосредственной близости от штриха.

2.8. Титрование фага методом агаровых слоев

Титрование фага позволяет определить количество частиц фага в титруемом материале. Метод основан на том, чтобы каждая частица фага дает зону просветления (лизиса) на чашке с газоном чувствительного к нему микроба, т.е. образует отдельную колонию.

Ход работы:

1. Приготовить десятикратные разведения исходной суспензии бактериофага в стерильном физиологическом растворе.
- 2) ГРМ-бульон, предварительно разлитый по 5 мл в пробирки, расплавляют и остужают в водяной бане до 48°C. Пробирки маркируют.
- 3) В каждую пробирку вносят 0,1 мл ночной бульонной культуры *E. coli*.
- 4) В пробирки с бульоном и культурой добавляют по 0,1 мл соответствующего разведения фаговой суспензии.
- 5) Тщательно перемешивают и выливают содержимое пробирки на чашку Петри с ГРМ-агаром, равномерно распределяя по поверхности агара.
- 6) После застывания верхнего слоя агара (10—15 мин) чашки переворачивают вверх дном и оставляют в термостате при 37°C на ночь.
- 7) На следующий день считают количество негативных колоний на каждой чашке и определяют титр фага в исходном препарате с учетом фактора разведения и объема вносимого материала.

Например, если при нанесении на чашку 0,1 мл фаговой суспензии при разведении $1 \cdot 10^7$ на этой чашке образовалось 150 стерильных пятен,

то титр фаголизата будет равен $(150 \times 10) 10^7 = 1,5 \cdot 10^{10}$ частиц в 1 мл.

2.9. Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Лизирующий раствор (Р)» (Вектор-Бест). Набор представляет собой пробирки объемом 1,5 мл, содержащие по 0,5 мл лизирующего раствора (рисунок 1).



Рисунок 1. Набор реагентов для выделения ДНК из клинических образцов «Лизирующий раствор (Р)» (Вектор-Бест)

Ход работы:

- 1) Промаркировать пробирки и установить в штатив;
- 2) Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок с транспортным раствором, содержащим анализируемый материал.
- 3) В пробирки, содержащие лизирующий раствор, внести по 100 мкл пробы, используя наконечники с аэрозольным барьером.
- 4) Пробирки плотно закрыть крышками и защелкнуть замочек на крышках, ресуспендировать (рисунок 2).

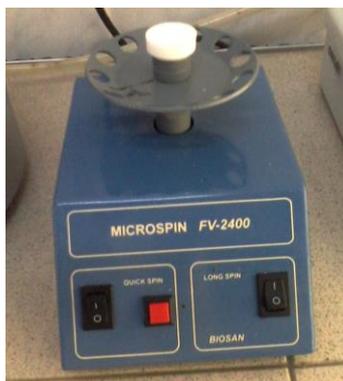


Рисунок 2. Вортекс MicrospinFV-2400, BIOSAN.

5) Поместить пробирки в предварительно прогретый до 98°C в течение 15 минут (рисунок 3).



Рисунок 3. Термостат для пробирки типа «эпшендорф» от 25 до 1000°C ThermoShakerTS-100, BIOSAN

6) После прогрева пробирки необходимо охладить до температуры $(18-25)^{\circ}\text{C}$, перенести в центрифугу и центрифугировать при 13000 об/мин при температуре $(18-25)^{\circ}\text{C}$ в течение 1 минуты (рисунок 4).



Рисунок 4. Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф»
до 16 тыс. об./мин CentrifugeCM-50

7) Пробы готовы к постановке реакции ПЦР. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

2.10. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Среди разновидностей методов ПЦР одним из наиболее современных является ПЦР в реальном времени. В его основе лежит принцип детекции продуктов непосредственно в ходе процесса амплификации. Метод основан на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле.

Важнейшей чертой этого метода является синхронизация процессов регистрации и амплификации, что позволяет наиболее точно оценить кинетику протекающего процесса, зависящую от начального количества исследуемого материала.

ПЦР в реальном времени характеризуется возможностью проведения качественного и количественного анализа. Регистрируемое в процессе амплификации нарастание сигнала от отделенного флуорофора прямо пропорционально увеличению концентрации синтезированных специфических продуктов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице.

Амплификацию участков ДНК проводили с использованием стандартных наборов реагентов «ПЦР-микс: 2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол). Набор содержит все необходимые реактивы: дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ПЦР-буфер, $MgCl_2$, Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, деионизированную воду, кроме праймеров и зондов.

Ход работы:

1) Промаркировать и установить пробирки с выделенной ДНК, 2,5х ной реакционной смесью в присутствии SYBR Green I, ddH₂O, растворами пары родоспецифичных праймеров, положительный контрольный образец (ПКО) с ДНК бактерий, ПКО с ДНК бактерий для разморозки.

2) Подготовить стерильную пробирку объемом 1,5 мл.

3) Приготовить общую реакционную смесь для бактерий, добавить 300 мкл ddH₂O, 300 мкл 2,5х-ной реакционной смеси SYBR Green I, по 30 мкл каждого праймера из родоспецифичной пары. Тщательно перемешать на вортексе.

4) Отобрать пинцетом 29 одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,2 мл и установить в штатив соответствующим образом.

5) Внести по 22 мкл общую реакционную смесь для бактерий, используя наконечник с фильтром.

6) В каждую пробирку внести по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром, затем в следующие пробирки внести ПКО. В качестве отрицательного контроля в последних пробирках использовать 3 мкл ddH₂O.

7) Пробирки плотно закрыть, перемешать содержимое встряхиванием, затем перенести пробирки в амплификатор и расставить соответствующим образом.

8) На приборе создать эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указать объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запустить программу с параметрами.

Правила создания и запуска программы амплификации на детектирующем амплификаторе CFX96 Touch «REAL TIME» (Bio-Rad, США)

1. Включаем источник питания прибора.

2. Нажимаем «Пуск», затем программное обеспечение «Bio-Rad CFX Manager»

3. Для того, чтобы открыть крышку прибора нажимаем «Файл», «Повторить эксперимент» и выбираем любую из представленных программ. Крышка открылась. Вкладку закрываем.

4. Устанавливаем пробирки в ячейки.

5. Нажимаем «Файл», «Создать эксперимент».

6. Нажимаем «Протокол», «Редактировать».

7. Устанавливаем температуру и время для первых трех режимов амплификации (например, 95°C for 5:00; 95°C for 0:10; 59°C for 0:25).

8. Нажимаем «Вставить шаг».

9. Устанавливаем температуру и время для следующего режима (например, 72°C for 0:30).

10. Нажимаем на кнопку «Удаление чтения плашки»

11. Устанавливаем количество циклов (например, 34).

12. Указываем объем пробы (например, 25 мкл). Нажимаем «ОК» и сохраняем изменения.

13. Нажимаем на вкладку «Плашка», «Редактировать».

14. Выделяем все ячейки и нажимаем «Очистить лунки».

15. Переключаем режим сканирования на «SYBR/FAM».

16. Нажимаем «Выбрать флуорофоры» и ставим галочку над «SYBR», нажимаем «ОК».

17. Нажимаем «Тип пробы», «Неизвестен».

18. Устанавливаем «Имя пробы»: выделяем ячейку, вводим имя пробы и нажимаем «Загрузить». Данные сохраняем.

19. Нажимаем «Закрыть крышку», «Начать прогон», «Сохранить».

2.11. Ранговая статистика

Ранговой статистикой называется любая статистика, которая является

функцией от рангов элементов r_i , а не от их значений x_i . Переход от значений к их рангам позволяет строить непараметрические статистические тесты, которые не опираются на априорные предположения о функции распределения выборки. Они имеют гораздо более широкую область применения, чем параметрические статистические тесты.

Применение непараметрических критериев для оценки достоверности показателей исследований для несвязанных совокупностей.

Эти критерии особенно часто применяются в исследованиях, где имеются опытные и контрольные группы, где необходимо сравнить результаты двух групп наблюдений, относящихся к различным заболеваниям или стадиям болезни и т.д.

Критерий Уайта.

Последовательность расчета:

1. Данные рядов X и Y ранжируются от меньшей величины к большей вне зависимости от их принадлежности к тому или иному ряду.
2. Ранги суммируются отдельно для рядов X и Y.
3. Меньшая из сумм оценивается по таблице.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Активность бактериофага по отношению к чистой культуре

Для исследования возможного влияния бактериофагов на рост *Bifidobacterium spp.* в качестве тестируемой чистой культуры использовали *Bifidobacterium bifidum* из пробиотика Бифидобактерин и препарат «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (производство ФГУП НПО «Микроген», Россия).

Сравнительный анализ проводили на жидкой питательной среде «Бифидум-среда» (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск) с добавлением Пиобактериофага и без.

При культивировании в жидкой питательной среде при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях в эксикаторе со свечой при повышенном содержании CO_2 в течение 24-48 часов во всех пробирках наблюдали колонии типа «комет», «гвоздиков», «тяжей» различной степени четкости, расположенные по всему объему среды и прозрачной зоной в верхней части, что характерно для бактерий рода *Bifidobacterium* (рисунок 5, таблица 2).

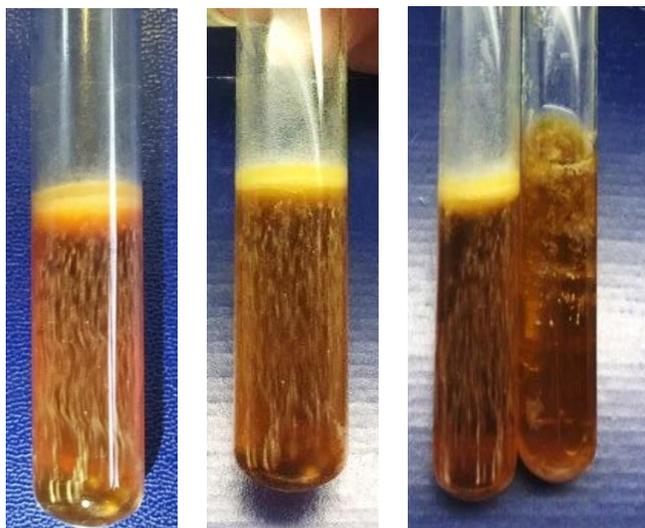


Рисунок 5 – Рост *Bifidobacterium spp.* в жидкой питательной среде

Таблица 2 – Рост *Bifidobacterium spp.* в жидкой питательной среде

| Испытуемая культура | <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
|--|--------------------------------|
| Питательные среды | |
| Жидкая питательная среда для выделения и культивирования <i>Bifidobacterium spp.</i> «Бифидум-среда» | + + + |
| -//- с добавлением Пиобактериофага | + + + |

Примечание: «+» - наличие роста бактерий.

Таким образом, в жидкой селективной питательной среде данный Пиобактериофаг не влияет и не подавляет рост *Bifidobacterium spp.*

Далее сравнительный анализ проводили на плотной питательной среде «ГРМ-агар» (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск) с добавлением Пиобактериофага и без.

При культивировании на питательной среде при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях в эксикаторе со свечой при повышенном содержании CO_2 в течение 24-48 часов на всех чашках Петри наблюдали колонии плоские, полушаровидные, блестящие, шероховатые, окруженные валиком, имеющие более темный центр, от белого и серого до темно-коричневого, что характерно для бактерий рода *Bifidobacterium* (рисунок 6, таблица 3).

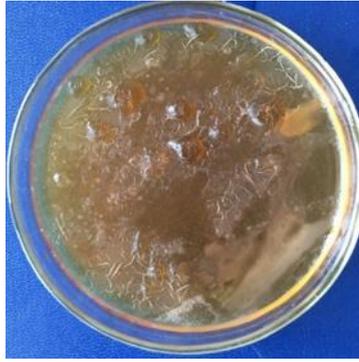


Рисунок 6 – Рост *Bifidobacterium spp.* на плотной неселективной питательной среде для культивирования микроорганизмов

Таблица 3 – Рост *Bifidobacterium spp.* на плотной неселективной питательной среде для культивирования микроорганизмов

| Испытуемая культура | <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
|--|--------------------------------|
| Питательные среды | |
| Плотная неселективная питательная среда для культивирования микроорганизмов «ГРМ-агар» | + + + |
| -//- с добавлением Пиобактериофага | + + + |

Примечание: «+» - наличие роста бактерий.

Для дальнейшей идентификации проводили окраску по Граму колоний, выросших на питательных средах (рисунок 7, рисунок 8).

Bifidobacterium spp. – грамположительные палочки, располагаются поодиночке, в парах, в виде фигуры V-образной формы. Их размер составляет 1-8 мкм.



Рисунок 7. Чистая культура бактерий *Bifidobacterium bifidum*, полученных на питательной среде без Пиобактериофага.

Окраска по Граму. $\times 1500$



Рисунок 8. Чистая культура бактерий *Bifidobacterium bifidum*, полученных на питательной среде с Пиобактериофагом.

Окраска по Граму. $\times 1500$

Таким образом, на плотной селективной питательной среде данный Пиобактериофаг не влияет и не подавляет рост *Bifidobacterium spp.*, а значит его можно использовать в дальнейшем исследовании.

Титрование Пиобактериофага поливалентного очищенного позволяет определить количество частиц фага в титруемом материале.

Приготовили десятикратные разведения исходной суспензии бактериофага в стерильном физиологическом растворе. На каждые 11 чашек Петри с агаром Эндо добавили стерильной пипеткой 0,1 мл ночной бульонной культуры *E. coli*, равномерно распределили по поверхности среды. На 10 чашек со средой и культурой добавляли по 0,1 мл соответствующего разведения фаговой суспензии, равномерно распределяя по поверхности агара. Одну чашку Петри со средой и культурой оставили без Пиобактериофага для контроля. После застывания чашки переворачивали вверх дном и оставляли в термостате при 37°C на ночь.

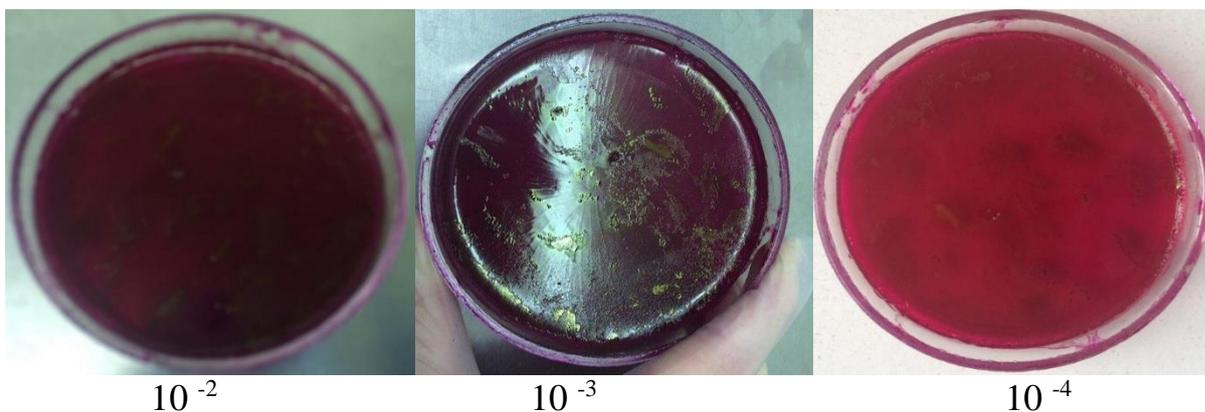
На следующий день считали количество негативных колоний на каждой чашке и определяли титр фага в исходном препарате с учетом фактора разведения и объема вносимого материала (таблица 4, рисунок 9).

Образование каждого стерильного пятна вызвано единственной частицей бактериофага. Например, если при нанесении на чашку 0,1 мл

фаговой суспензии при разведении 1×10^7 на этой чашке образовались 150 стерильных пятен, то титр фаголизата будет равен $(150 \times 10) 10^7 = 1,5 \cdot 10^{10}$ частиц в 1 мл (Атабеков И.Г., 2002).

Таблица 4 – Титрование фага методом агаровых слоев

| Разведение | Результаты |
|------------|---|
| 10^0 | Негативные колонии |
| 10^{-1} | Негативные колонии |
| 10^{-2} | Негативные колонии |
| 10^{-3} | Негативные колонии |
| 10^{-4} | Негативные колонии |
| 10^{-5} | Негативные колонии |
| 10^{-6} | Негативные колонии |
| 10^{-7} | Негативные колонии |
| 10^{-8} | Негативные колонии |
| 10^{-9} | Отсутствие негативных колоний, сплошной рост бактерий |
| 10^{-10} | Отсутствие негативных колоний, сплошной рост бактерий |
| Контроль | Сплошной рост бактерий |



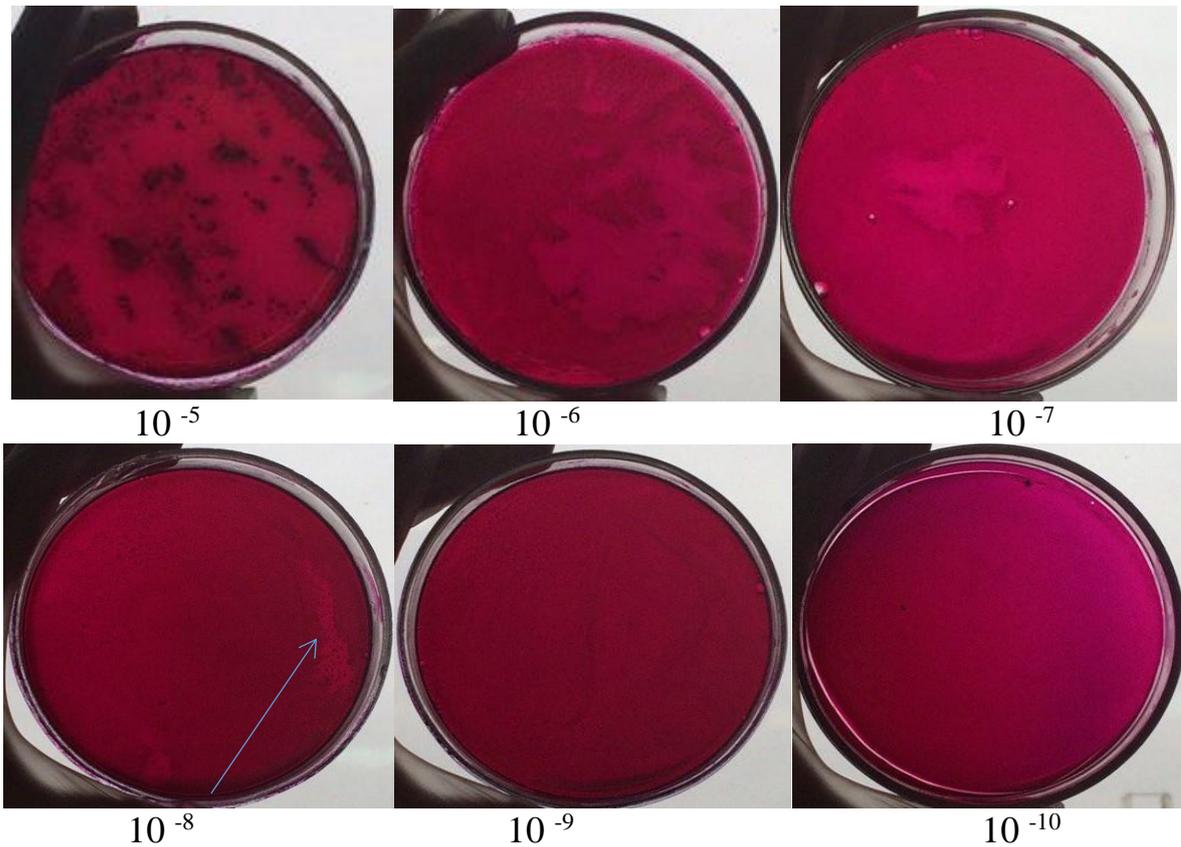


Рисунок 9 – Рост *E. coli* на агаре Эндо. Цифрами указаны разведения исходной суспензии Пиобактериофага. Стрелкой указана негативная колония.

Таким образом, при разведении 10^{-8} на этой чашке образовалось стерильное пятно, значит титр фаголизата равен $(1 \times 10) 10^8 = 1 \cdot 10^9$ частиц в 1 мл.

Концентрация Пиобактериофага составляет 10^9 БОЕ/мл

По литературным данным считается, что бактериальную суспензию заражают, внося суспензию фага с известным титром при множественности заражения 0,1 (отношение числа фаговых частиц к числу бактериальных клеток). При внесении небольшого количества фага в культуру чувствительных бактерий, активно размножающихся в жидкой питательной среде, частицы бактериофага адсорбируются на бактериальных клетках и после латентного периода лизируют их. Освободившееся в среду потомство частиц бактериофага заражает клетки, не вовлеченные в процесс инфекции, вызывая второй инфекционный цикл. Таким образом, последовательно

заражаются все клетки суспензии, и процесс продолжается асинхронно до тех пор, пока не произойдет лизис всех чувствительных бактерий [Атабеков И.Г., 2002].

Так как при дисбиотических процессах общая бактериальная масса в образце составляет 10^{10} КОЕ/мл, то для сохранения множественности заражения 0,1 необходимо вносить суспензию фага с титром 10^9 БОЕ/мл.

Значит, в дальнейших исследованиях на 1,0 мл или 1,0 г клинического материала добавляем 1,0 мл исходной суспензии Пиобактериофага с концентрацией 10^9 БОЕ/мл без дополнительного разведения.

Для проверки активности используемого Пиобактериофага по отношению к условно-патогенным микроорганизмам проводили посев и контроль роста бактерий на ГРМ-бульоне с добавлением Пиобактериофага и без.

Стерильный ГРМ-бульон в асептических условиях разливали в подготовленные 44 пробирки по 10,0 мл. В первые 22 пробирки добавляли по 1,0 мл препарата «Пиобактериофаг» (опыт), во вторые 22 пробирки – 1,0 мл дистиллированной воды (контроль).

В каждые 3 пробирки с ГРМ-бульоном и Пиобактериофагом (опыт) и 3 с ГРМ-бульоном без Пиобактериофага (контроль) проводили посев бактериологической петлей чистых культур *Escherichia coli* ФПМ 1, *Klebsiella pneumonia* ФПМ 2, *Staphylococcus aureus* ФПМ 3, *Pseudomonas aeruginosa* ФПМ 4, *Candida albicans* ФПМ 5, *Streptococcus spp.* ФПМ 6, *Enterococcus faecium* ФПМ 7. Для контроля стерильности среды, оставшиеся по одной контрольной и опытной пробирки, не заседали культурами. Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

В результате во всех пробирках с ГРМ-бульоном и посевами микроорганизмов отмечали диффузное помутнение среды. В пробирках с ГРМ-бульоном с добавлением Пиобактериофага отсутствует рост бактерий (таблица 5).

Таблица 5 – Рост условно-патогенных микроорганизмов в ГРМ-бульоне

| Испытуемые культуры | <i>Escherichia coli</i> ФПМ 1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ФПМ 2 | <i>Staphylococcus aureus</i> ФПМ 3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ФПМ 4 | <i>Candida albicans</i> ФПМ 5 | <i>Streptococcus spp.</i> ФПМ 6 | <i>Enterococcus faecium</i> ФПМ 7 | Без бактерий |
|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| Питательные среды | | | | | | | | |
| ГРМ-бульон | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | --- |
| -//- с добавлением Пиобактериофага | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

Примечание: «-» - отсутствие роста бактерий; «+» - наличие роста бактерий.

Таким образом, на неселективном ГРМ-бульоне с Пиобактериофагом подавляется рост всех исследуемых условно-патогенных микроорганизмов.

Бифидум-среда используется для выделения и культивирования бактерий *Bifidobacterium spp.*, при этом подавляется рост условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Для сравнительной оценки селективных свойств провели посев штаммов условно-патогенных бактерий в пробирки с Бифидум-средой без модификаций и Бифидум-средой с добавлением Пиобактериофага.

Стерильную Бифидум-среду в асептических условиях разливали в подготовленные 44 пробирки по 10,0 мл. В первые 22 пробирки добавляли по 1,0 мл препарата «Пиобактериофаг» (опыт), во вторые 22 пробирки – 1,0 мл дистиллированной воды (контроль).

В каждые 3 пробирки с Бифидум-средой и Пиобактериофагом (опыт) и 3 с Бифидум-средой без Пиобактериофага (контроль) проводили посев бактериологической петлей чистых культур *Escherichia coli* ФПМ 1, *Klebsiella pneumoniae* ФПМ 2, *Staphylococcus aureus* ФПМ 3, *Pseudomonas aeruginosa* ФПМ 4, *Candida albicans* ФПМ 5, *Streptococcus spp.* ФПМ 6,

Enterococcus faecium ФПМ 7. Для контроля стерильности среды, оставшиеся по одной контрольной и опытной пробирки не засеивали культурами. Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

В результате в пробирках с Бифидум-средой (без модификаций) при росте кишечной палочки *Escherichia coli* наблюдали диффузное помутнение столбика среды с газообразованием в виде пены, синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* – диффузное помутнение верхней части столбика среды с последующим распространением помутнения вниз по среде.

В пробирках с Бифидум-средой с добавлением Пиобактериофага отсутствует рост бактерий (таблица 6).

Таблица 6 – Рост условно-патогенных микроорганизмов в Бифидум-среде

| Испытуемые культуры | <i>Escherichia coli</i> ФПМ 1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ФПМ 2 | <i>Staphylococcus aureus</i> ФПМ 3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ФПМ 4 | <i>Candida albicans</i> ФПМ 5 | <i>Streptococcus spp.</i> ФПМ 6 | <i>Enterococcus faecium</i> ФПМ 7 | Без бактерий |
|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| Питательные среды | | | | | | | | |
| Бифидум-среда | +++ | --- | --- | +++ | --- | --- | --- | --- |
| -//- с добавлением Пиобактериофага | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

Примечание: «—» - отсутствие роста бактерий; «+» - наличие роста бактерий.

Таким образом, на Бифидум-среде с Пиобактериофагом подавляется рост условно-патогенных микроорганизмов.

Предлагаемая модифицированная среда для *Bifidobacterium spp.* с добавлением Пиобактериофага имеет преимущество, так как на ней подавляется рост некоторых условно-патогенных микроорганизмов. Таким

образом, были повышены селективные и ингибирующие свойства известной питательной среды.

3.2. Активность бактериофага в клиническом материале

Для исследования селективных свойств Пиобактериофага в клиническом материале и оценке изменения выхода бифидобактерий были получены образцы содержимого кишечника практически здоровых людей. Для определения исходной концентрации бифидобактерий в клиническом материале до эксперимента и после накопления в Бифидум-среде без модификаций и с добавлением Пиобактериофага использовали метод десятикратных разведений (рисунок 10).

Разведения делали в пробирках (5 шт. на один клинический материал), содержащих по 4,5 мл жидкой селективной питательной среды. В первую пробирку вносили 0,1 г клинического материала и считали это разведение первым (10^{-1}). Содержимое пробирки тщательно перемешивали, при помощи автоматического дозатора со съемными стерильными наконечниками с фильтром переносили 0,5 мл суспензии во вторую пробирку, получая при этом второе разведение (10^{-2}). Таким же образом готовили и последующие разведения (до 10^{-5}). Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

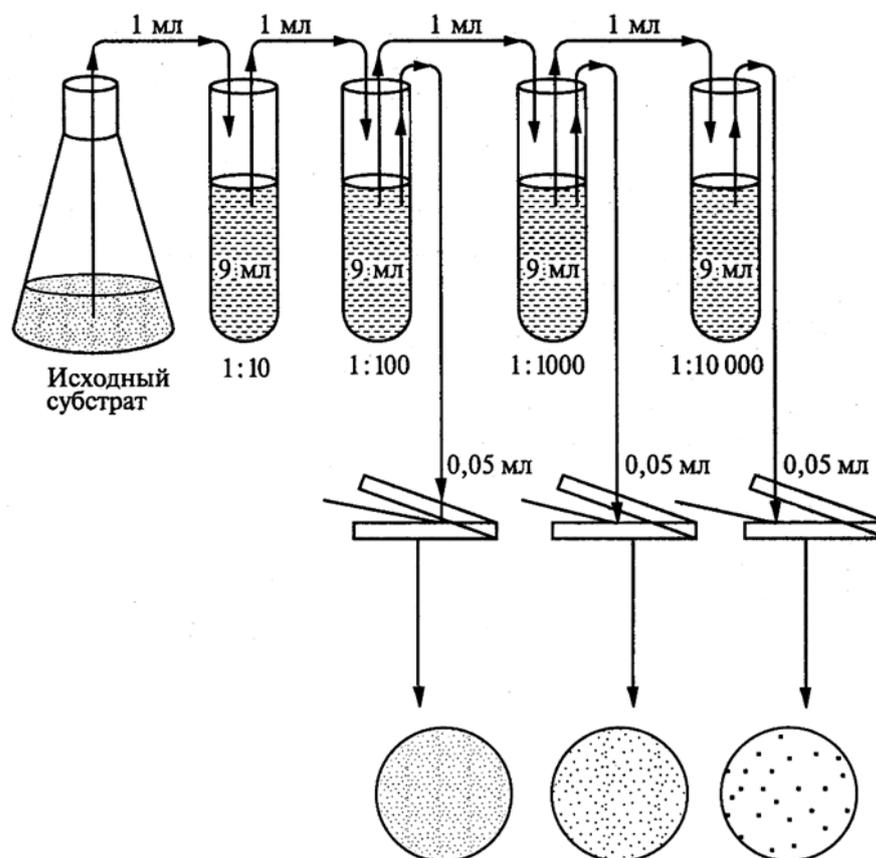


Рисунок 10 – Схема приготовления десятикратных разведений

Через 24 ч. из термостата достали 25 пробирок с 4,5 мл Бифидум-среды, в которых готовили десятикратные разведения клинического материала.

Результат учитывают визуально. Присутствие *Bifidobacterium spp.* устанавливали по наличию колоний типа «комет», «гвоздиков», «тяжей» различной степени четкости, расположенные по всему объему столбика среды и прозрачной зоной в верхней части.

Из содержимого пробирок готовили фиксированные препараты, окрашивали по Граму. Отмечали по морфологии грамположительные палочки бактерий, расположенные поодиночке, в парах, в виде фигуры V-образной формы.

Пробирки, в которых обнаружена кокковая флора или грамотрицательные палочки, не учитывались.

Оценку количественного содержания *Bifidobacterium spp.* определяли по максимальному разведению, в котором обнаружены типичные грамположительные палочки.

Таблица 7 – Результаты определения исходной концентрации бифидобактерий, КОЕ/г

| № клинического материала | Исходная концентрация бифидобактерий, КОЕ/г |
|--------------------------|---|
| 1 | 10 |
| 2 | 10 ² |
| 3 | 10 ³ |
| 4 | 10 ² |
| 5 | 10 ² |

Для получения накопительной культуры бифидобактерий был проведен посев 1,0 г клинического материала (кал) в 2 пробирки: контроль и опыт (с Пиобактериофагом), соответственно номеру материала. Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 48-72 ч.

Через 48 ч. готовили серию 10-кратных разведений полученных накопительных культур из опытных с Бифидум-средой и контрольных пробирок с Бифидум-средой и Пиобактериофагом.

Для контрольных пробирок разведения делали в 10 пробирках, содержащих по 4,5 мл жидкой селективной питательной среды, при помощи автоматического дозатора со съемными наконечниками, путем последовательного перенесения из пробирки в пробирку по 0,5 мл. Титрование по 0,5 мл производили до 10⁻¹⁰.

Для опытных пробирок (БФ) разведения делали в 10 пробирках, содержащих по 4,0 мл жидкой селективной питательной среды и 0,5 мл препарата «Пиобактериофаг».

Пробирки с последними пятью разведениями с 10^{-6} до 10^{-10} инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

Через 24 ч. из термостата достали 25 пробирок с Бифидум-средой и 25 пробирок с Бифидум-средой и Пиобактериофагом. Результат учитывают визуально. Присутствие бактерий устанавливали по наличию колоний типа «комет», «гвоздиков», «тяжей» различной степени четкости, расположенные по всему объему столбика среды и прозрачной зоной в верхней части.

Из содержимого пробирок готовили фиксированные препараты, окрашивали по Граму. Отмечали по морфологии грамположительные палочки бактерий, расположенные поодиночке, в парах, в виде фигуры V-образной формы.

Пробирки, в которых обнаружена кокковая флора или грамотрицательные палочки, не учитывались.

Оценку количественного содержания *Bifidobacterium spp.* определяли по максимальному разведению, в котором обнаружены типичные грамположительные палочки.

Таблица 8 – Клинический материал №1

| Разведение | Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки) | |
|------------|---|---|
| | Клинический материал №1 (без Пиобактериофага) | Клинический материал №1БФ (с Пиобактериофагом) |
| 10^{-6} | Гр+ палочки | Гр+ палочки |
| 10^{-7} | не обнаружено | Гр+ палочки |
| 10^{-8} | не обнаружено | Гр+ палочки |
| 10^{-9} | не обнаружено | не обнаружено |
| 10^{-10} | не обнаружено | не обнаружено |

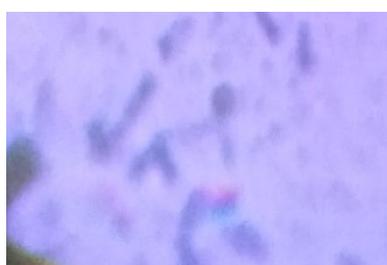
Вывод по клиническому материалу №1: Конечная концентрация бактерий рода *Bifidobacterium* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила 10^8 КОЕ/г, в контрольной – 10^6 КОЕ/г.



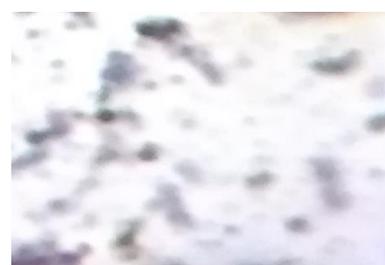
Рисунок 11 – Клинический материал №1 (без Пиобактериофага), разведение 10^{-6} . Окраска по Граму $\times 1500$



10^{-8}



10^{-7}



10^{-6}

Рисунок 12 – Клинический материал №1БФ (с Пиобактериофагом). Цифрами указаны разведения. Окраска по Граму $\times 1500$

Цифрами указаны разведения. Окраска по Граму $\times 1500$

Таблица 9 – Клинический материал №2

| Разведение | Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки) | |
|------------|---|---|
| | Клинический материал №2 (без Пиобактериофага) | Клинический материал №2БФ (с Пиобактериофагом) |
| 10^{-6} | не обнаружено | не обнаружено |
| 10^{-7} | не обнаружено | не обнаружено |
| 10^{-8} | Гр+ палочки | не обнаружено |
| 10^{-9} | не обнаружено | Гр+ палочки |
| 10^{-10} | не обнаружено | не обнаружено |

Вывод по клиническому материалу №2: Конечная концентрация бактерий рода *Bifidobacterium* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила 10^9 КОЕ/г, в контрольной – 10^8 КОЕ/г.



Рисунок 13 – Клинический материал №2 (без Пиобактериофага), разведение 10^{-8} . Окраска по Граму $\times 1500$



Рисунок 14 – Клинический материал №2БФ (с Пиобактериофагом), разведение 10^{-9} . Окраска по Граму $\times 1500$

Таблица 10 – Клинический материал №3

| Разведение | Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки) | |
|------------|---|---|
| | Клинический материал №3 (без Пиобактериофага) | Клинический материал №3БФ (с Пиобактериофагом) |
| 10^{-6} | Гр+ палочки, кокки | Гр+ палочки |
| 10^{-7} | Гр+ палочки, кокки | Гр+ палочки |
| 10^{-8} | Гр+ палочки, кокки | Гр+ палочки |
| 10^{-9} | Гр+ палочки, кокки | Гр+ палочки |
| 10^{-10} | не обнаружено | не обнаружено |

Вывод по клиническому материалу №3: Конечная концентрация бактерий рода *Bifidobacterium* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила 10^9 КОЕ/г, в контрольной – 10^9 КОЕ/г. Однако, в опытной пробирке наблюдается культура, однородная по морфотинкториальным признакам, в то время как в контрольной пробирке без добавления Пиобактериофага помимо грамположительных палочек наблюдалась еще и посторонняя кокковая флора, которая не позволяла в данном случае выделить чистую культуру.

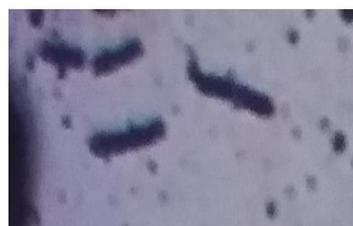
 10^{-9}  10^{-8}  10^{-7}  10^{-6}

Рисунок 15 – Клинический материал №3 (без Пиобактериофага).

Цифрами указаны разведения. Окраска по Граму $\times 1500$

 10^{-9}  10^{-8}

10⁻⁷10⁻⁶

Рисунок 16 – Клинический материал №3БФ (с Пиобактериофагом).

Цифрами указаны разведения. Окраска по Граму ×1500

Таблица 11 – Клинический материал №4

| Разведение | Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки) | |
|-------------------|---|---|
| | Клинический материал №4 (без Пиобактериофага) | Клинический материал №4БФ (с Пиобактериофагом) |
| 10 ⁻⁶ | Гр+ палочки | не обнаружено |
| 10 ⁻⁷ | не обнаружено | не обнаружено |
| 10 ⁻⁸ | не обнаружено | Гр+ палочки |
| 10 ⁻⁹ | не обнаружено | не обнаружено |
| 10 ⁻¹⁰ | не обнаружено | не обнаружено |

Вывод по клиническому материалу №4: Конечная концентрация бактерий рода *Bifidobacterium* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила 10⁸ КОЕ/г, в контрольной – 10⁶ КОЕ/г.

Таблица 12 – Клинический материал №5

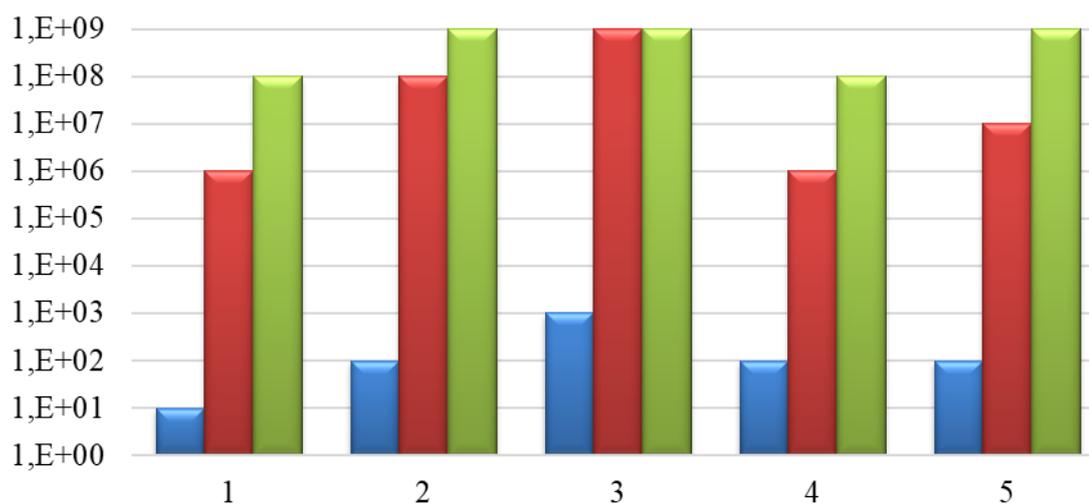
| Разведение | Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки) | |
|------------------|---|---|
| | Клинический материал №5 (без Пиобактериофага) | Клинический материал №5БФ (с Пиобактериофагом) |
| 10 ⁻⁶ | не обнаружено | не обнаружено |
| 10 ⁻⁷ | Гр + палочки | не обнаружено |

| | | |
|------------|---------------|---------------|
| 10^{-8} | не обнаружено | не обнаружено |
| 10^{-9} | не обнаружено | Гр+ палочки |
| 10^{-10} | не обнаружено | не обнаружено |

Вывод по клиническому материалу №5: Конечная концентрация бактерий рода *Bifidobacterium* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила 10^9 КОЕ/г, в контрольной – 10^7 КОЕ/г.

Таблица 13 – Результаты определения исходной и конечной концентрации бифидобактерий, КОЕ/г

| № | Исходная концентрация бифидобактерий, КОЕ/г | Конечная концентрация бифидобактерий (контроль), КОЕ/г | Конечная концентрация бифидобактерий (с Пиобактериофагом), КОЕ/г |
|---|---|--|--|
| 1 | 10 | 10^6 | 10^8 |
| 2 | 10^2 | 10^8 | 10^9 |
| 3 | 10^3 | 10^9 | 10^9 |
| 4 | 10^2 | 10^6 | 10^8 |
| 5 | 10^2 | 10^7 | 10^9 |



- Исходная концентрация бифидобактерий, КОЕ/г
- Конечная концентрация бифидобактерий (контроль), КОЕ/г
- Конечная концентрация бифидобактерий (с Пиобактериофагом), КОЕ/г

Рисунок 17 – Результаты определения исходной и конечной концентрации бифидобактерий, КОЕ/г

Среднее значение исходной концентрации бифидобактерий в клинических материалах составила $2,6 \times 10^2$ КОЕ/г (таблица 14). Конечная концентрация бифидобактерий по сравнению с исходной в питательной среде с Пиобактериофагом увеличилась в 10^6 раз (среднее значение $6,4 \times 10^8$ КОЕ/г), различия статистически значимы ($p=0.035600$, значение t-критерия Стьюдента 2.60, таблица 15). В то время как в среде без модификаций концентрация увеличилась в 10^5 раз (среднее значение $2,2 \times 10^8$ КОЕ/г), различия статистически не значимы ($p=0.245266$, значение t-критерия Стьюдента 1.27).

Таким образом, модификация питательной среды Бифидум-среда с использованием Пиобактериофага позволяет повысить выход биомассы бифидобактерий.

Таблица 14 – Статистический анализ полученных данных

| | Исходная концентрация бифидобактерий, КОЕ/г | Конечная концентрация бифидобактерий (контроль), КОЕ/г | Конечная концентрация бифидобактерий (с Пиобактериофагом), КОЕ/г |
|------------------------|---|--|--|
| Среднее | 262 | 2,22E+08 | 6,40E+08 |
| Стандартная ошибка | 185,32 | 1,95E+08 | 2,20E+08 |
| Медиана | 100 | 1,00E+07 | 1,00E+09 |
| Мода | 100 | 1,00E+06 | 1,00E+09 |
| Стандартное отклонение | 414,39 | 4,37E+08 | 4,93E+08 |
| Дисперсия выборки | 171720 | 1,91E+17 | 2,43E+17 |

Таблица 15 – Расчет t-критерия Стьюдента при сравнении средних величин

| | Группы сравнения | | |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|---|
| | Исходная / Конечная (контроль) | Исходная / Конечная (БФ) | Конечная (контроль) / Конечная (БФ) |
| Значение t- критерия Стьюдента | 1.02 | 2.60 | 1.27 |
| Значение p | 0.342313 | 0.035600 * | 0.245266 |
| Число степеней свободы, f | 8 | 8 | 8 |
| Критическое значение t- критерия Стьюдента | 2.306 | 2.306 | 2.306 |
| Уровень значимости, α | 0,05 | 0,05 | 0,05 |

Примечание: * - различия статистически значимы

3.3. Получение антагонистически активных штаммов

Чистые культуры штаммов бифидобактерий получали из накопительных культур, полученных из клинического материала, на питательной среде с Пиобактериофагом. Для этого провели рассев материала по методу Коха в 3 чашки Петри.

На поверхность питательной среды в чашке № 1 нанесли бактериологической петлей каплю накопительной культуры и распределили ее по всей поверхности. Петлю достали, чашку быстро закрыли и перенесли петлю в чашку № 2, не стерилизуя ее. Распределили культуру по всей поверхности среды. Точно те же действия проводили и в чашке № 3, после

чего петлю стерилизовали (рисунок 18). Засеянные чашки поместили в термостат в эксикатор и инкубировали в течение 24-48 ч при 37°C.



Рисунок 18 – Ход работы

Через 24 ч оценили рост колоний бактерий на 15 чашек Петри (рисунок 19-23).

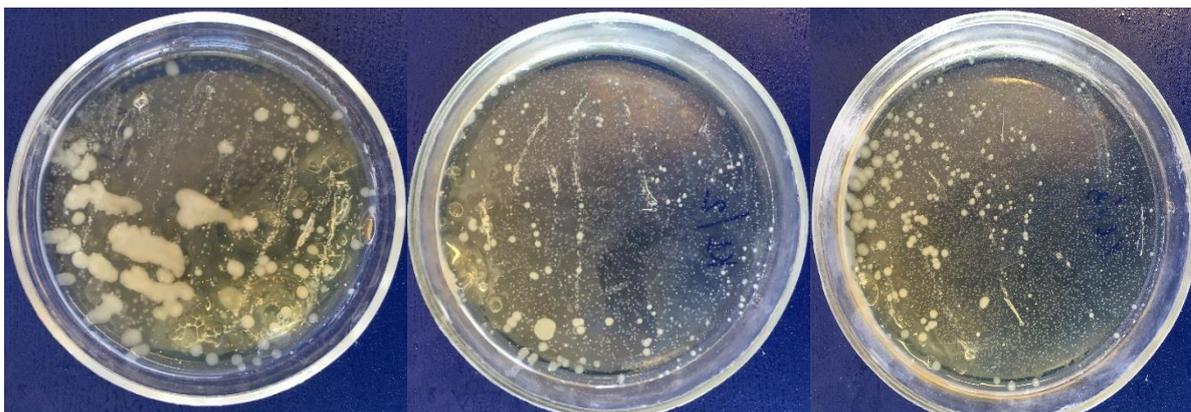


Рисунок 19 – Клинический материал №1БФ. Метод Коха

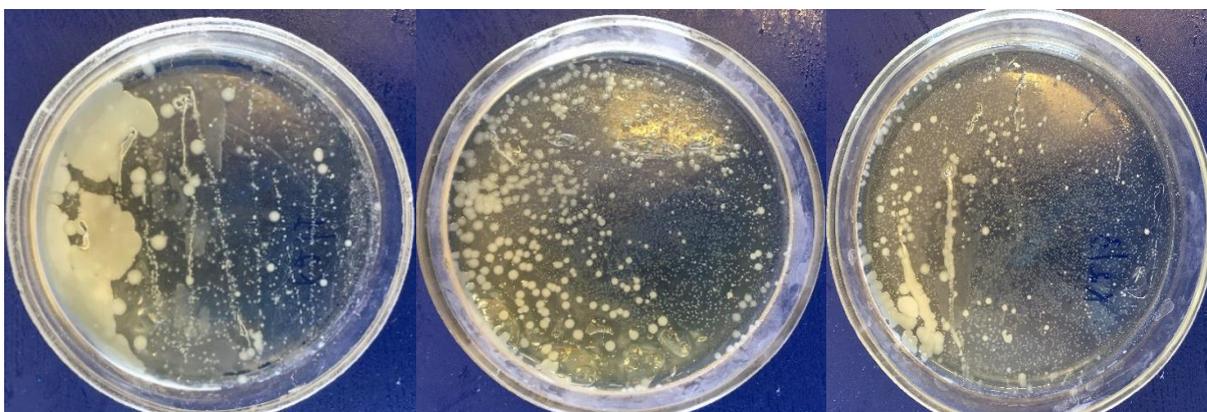


Рисунок 20 – Клинический материал №2БФ. Метод Коха



Рисунок 21 – Клинический материал №3БФ. Метод Коха

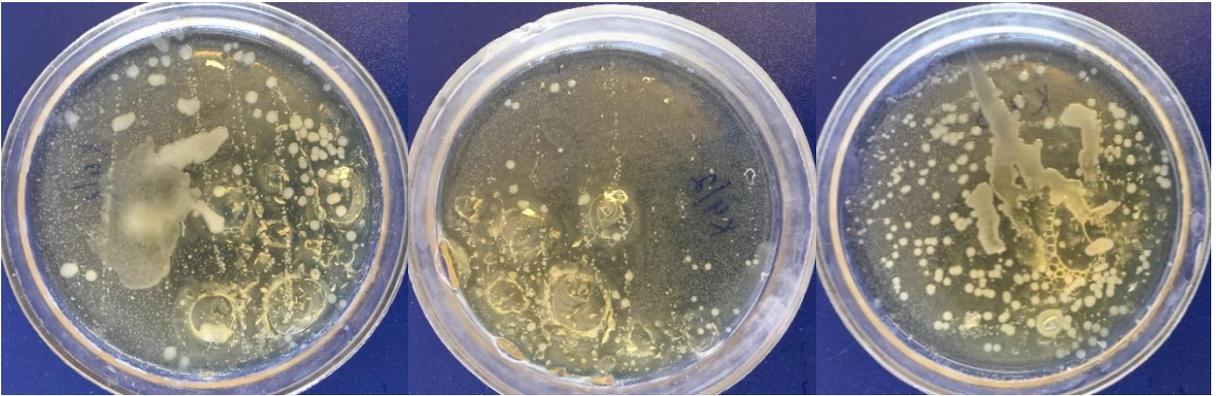


Рисунок 22 – Клинический материал №4БФ. Метод Коха

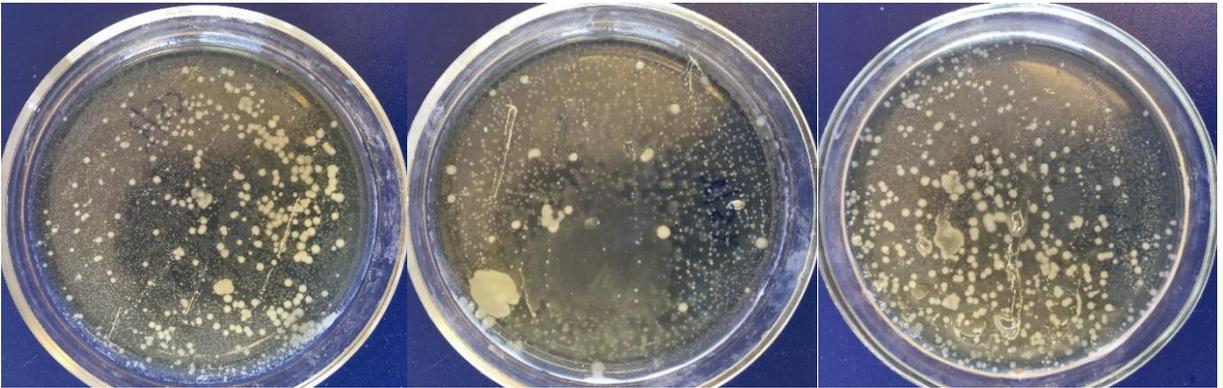


Рисунок 23 – Клинический материал №5БФ. Метод Коха

Изолированные колонии, морфологически соответствующие росту бактерий рода *Bifidobacterium*, выросшие на плотных питательных среды, пересеяли в пробирки с стерильной жидкой питательной средой «Бифидум-среда», которую в асептических условиях разлили в подготовленные 26 пробирок по 10,0 мл.

Чистую культуру *Bifidobacterium bifidum* из флакона с лиофилизированным пробиотиком «Бифидумбактерин» высеяли в отдельную пробирку. Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

Были отобраны чистые культуры, образующие колонии, морфологически соответствующие росту бактерий рода *Bifidobacterium*, т.е. колонии типа «комет» различной степени четкости, расположенные по всему объему среды и прозрачной зоной в верхней части.

Из образцов накопительных культур с наличием роста готовили фиксированные препараты, окрашивали по Граму и учитывали морфотинкториальные признаки, характерные для бифидобактерий: грамположительные палочки, неспорообразующие, располагаются поодиночке, в парах, или образуют фигуры V-образной формы.

Для дифференциации колоний бифидобактерий от лактобактерий проводили анализ методом ПЦР в режиме реального времени с родоспецифичными праймерами, комплементарными к консервативным 16S рРНК последовательностям *Bifidobacterium spp.*

Аmplификацию участков ДНК проводили с использованием стандартных наборов реагентов «ПЦР-микс: 2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол). Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом в 25 мкл, содержащей 3 мкл исследуемого образца ДНК, 10 мкл 2.5× ПЦР-микс, по 1 мкл прямого и обратного праймера пары родоспецифичных праймеров *Bifidobacterium spp.*, 10 мкл ddH₂O.

Для контроля проведения амплификации использовали положительный контрольный образец (ПКО) с ДНК *Lactobacillus spp.*, ПКО с ДНК *Bifidobacterium spp.*

Для ПЦР в режиме реального времени использовали амплификатор CFX96 Touch™ («BioRad», США) с программой с параметрами (таблица 16, рисунок 24). Учет результатов проводили с помощью программного

обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Результаты представлены в виде графиков амплификации. По окончании амплификации по показателю индикаторного цикла отметили положительные и отрицательные результаты (таблица 17, рисунок 25-32).

Таблица 16 – Режим амплификации

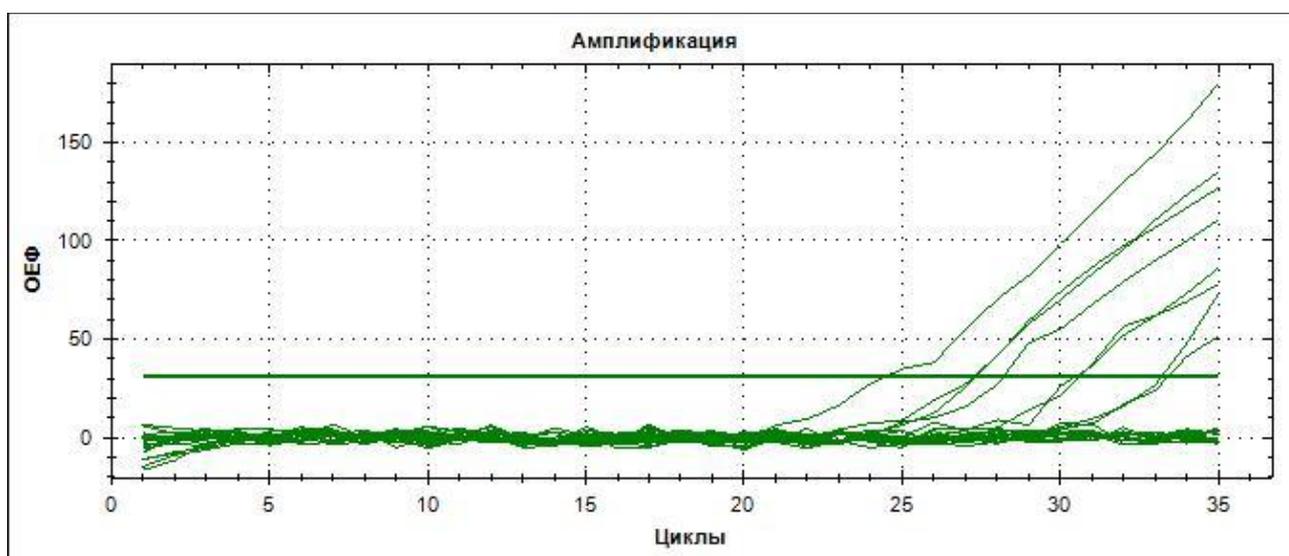
| | Температура | Время | Количество циклов |
|------------------------------|-------------|--------|-------------------|
| Исходная денатурация | 95 °С | 1 мин | 1 |
| Денатурация | 95 °С | 30 сек | 30 |
| Отжиг | 60 °С | 40 сек | |
| Элонгация + чтение плашки | 72 °С | 20 сек | |
| Финальное удлинение | 72 °С | 2 мин | 1 |



Рисунок 24 – Амплификатор CFX-96 «REAL TIME» (Bio-Rad США)

Таблица 17 – Программа Bio-Rad CFX Manager

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | 1 <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | 2 <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | 3 <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | 4 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 5 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 6 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 7 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный |
| D | 8 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 9 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 10 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 11 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 12 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 13 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 14 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 15 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 16 <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | 17 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 18 <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | 19 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный |
| E | 20 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 21 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 22 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 23 <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | 24 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 25 <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | 26 <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | ПКЛ <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | ПКБ <i>Bifido bacterium</i> spp. положительный | ОКО <i>Bifido bacterium</i> spp. отрицательный | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Рисунок 25 – Результаты амплификации ДНК, выделенных из полученных культур, с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium* spp.

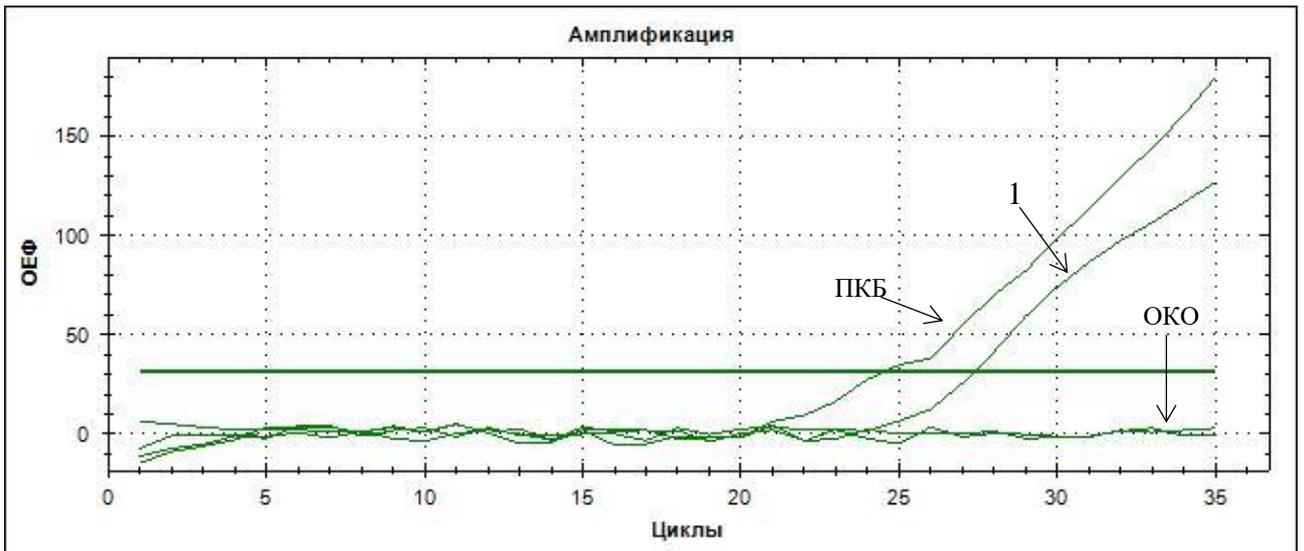


Рисунок 26 – Результаты амплификации ДНК культуры 1 с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium spp.*

Культура 1 – положительный, ПК *Bifidobacterium spp.* – положительный, ОКО – отрицательный

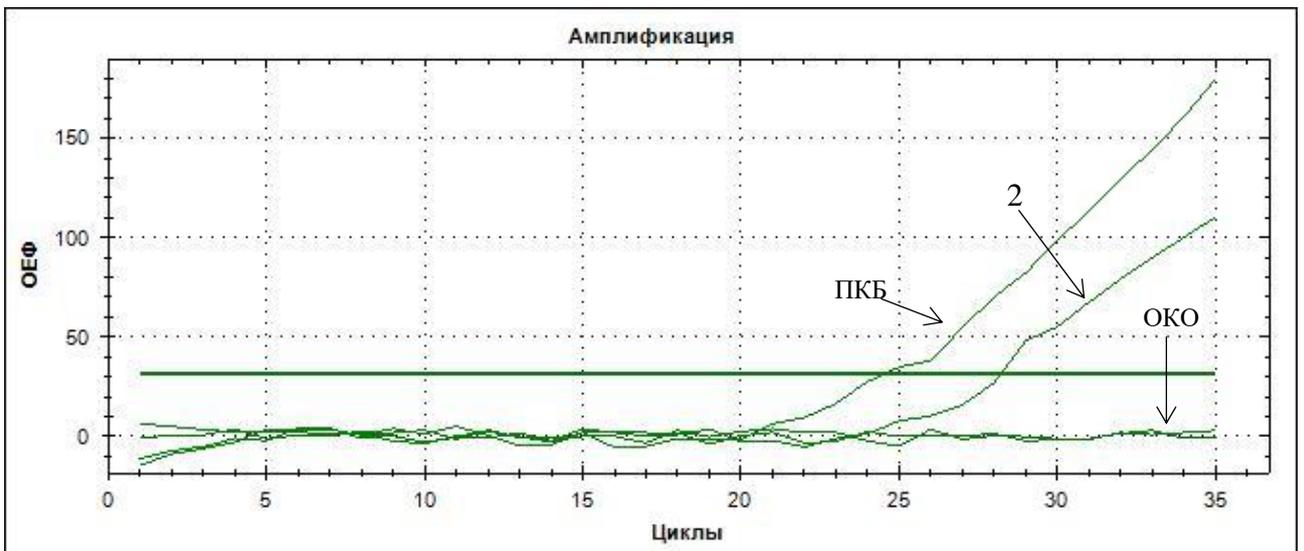


Рисунок 27 – Результаты амплификации ДНК культуры 2 с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium spp.*

Культура 2 – положительный, ПК *Bifidobacterium spp.* – положительный, ОКО – отрицательный

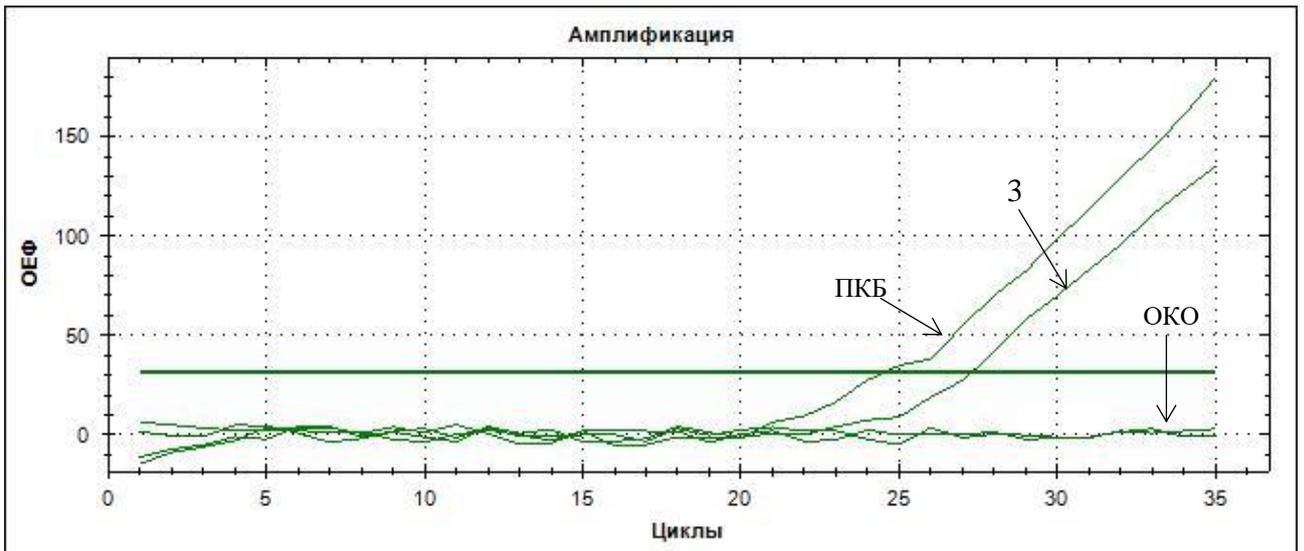


Рисунок 28 – Результаты амплификации ДНК культуры 3 с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium spp.*

Культура 3 – положительный, ПК *Bifidobacterium spp.* – положительный, ОКО – отрицательный

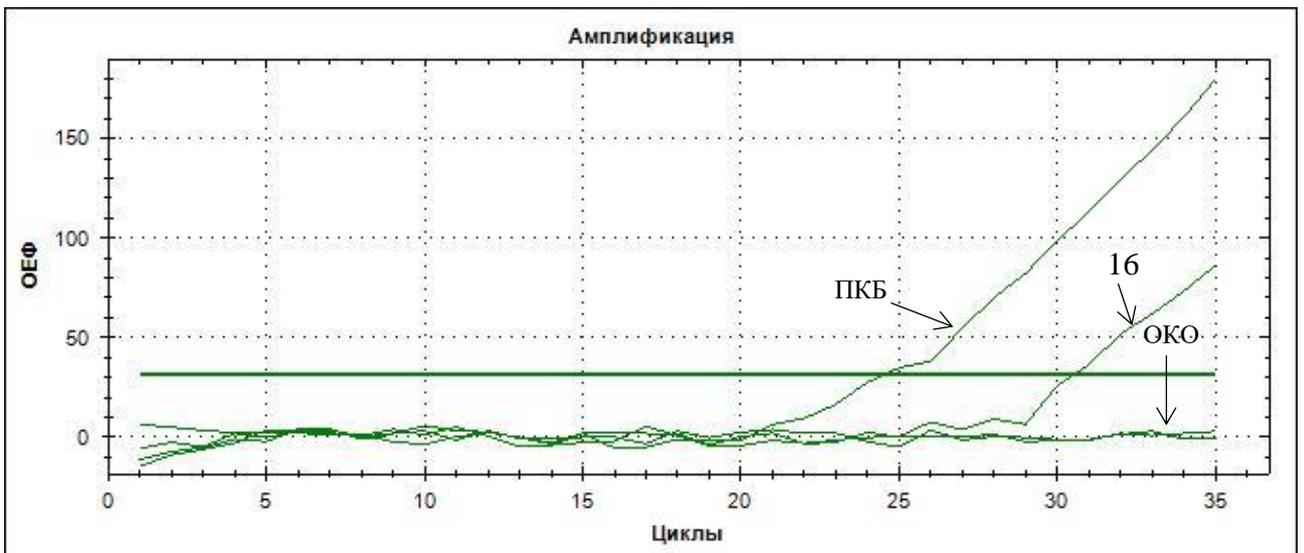


Рисунок 29 – Результаты амплификации ДНК культуры 16 с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium spp.*

Культура 16 – положительный, ПК *Bifidobacterium spp.* – положительный, ОКО – отрицательный

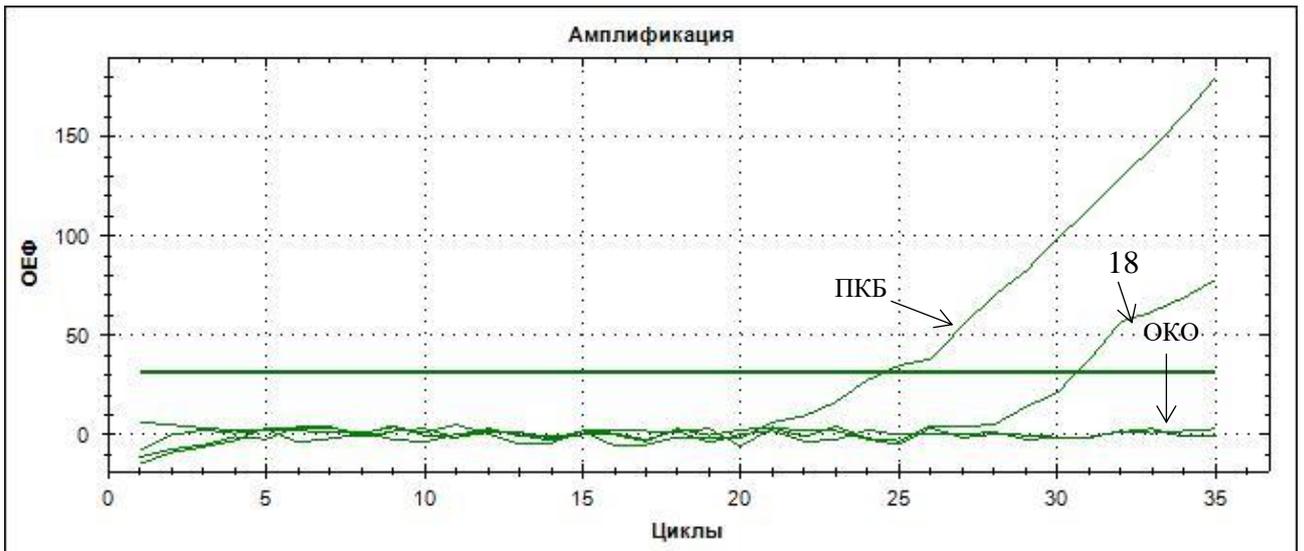


Рисунок 30 – Результаты амплификации ДНК культуры 18 с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium spp.*

Культура 18 – положительный, ПК *Bifidobacterium spp.* – положительный, ОКО – отрицательный

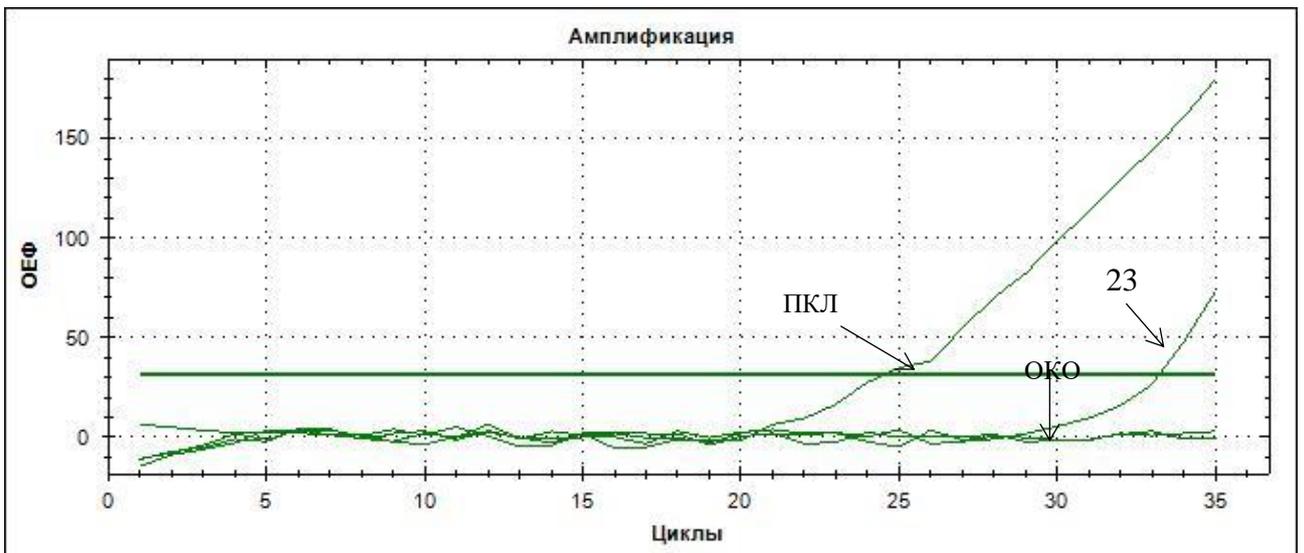


Рисунок 31 – Результаты амплификации ДНК культуры 23 с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium spp.*

Культура 23 – положительный, ПК *Bifidobacterium spp.* – положительный, ОКО – отрицательный

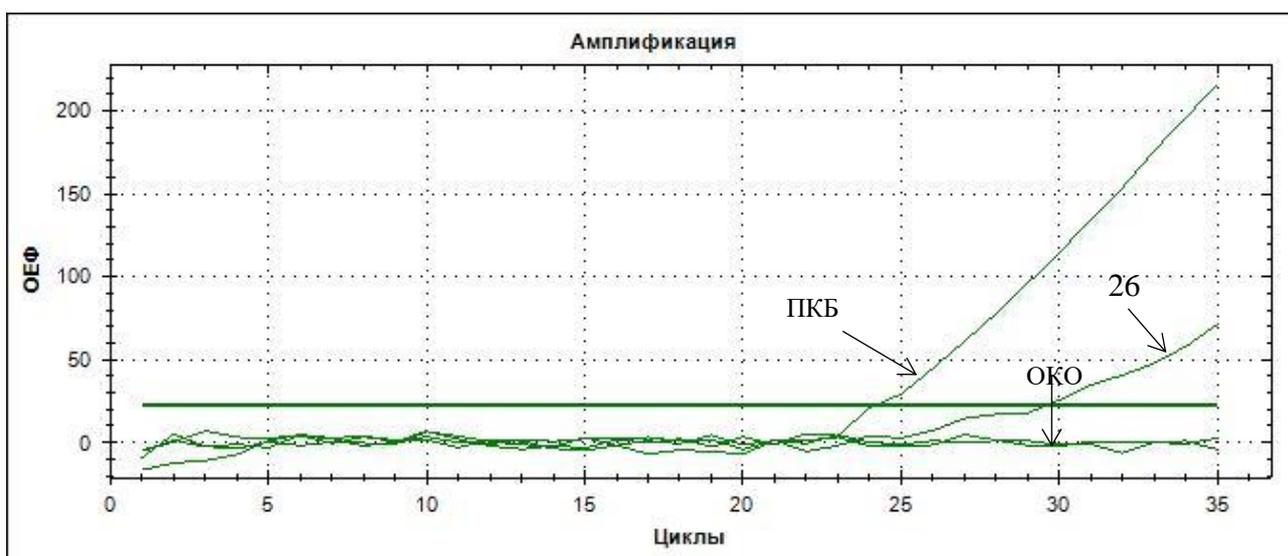


Рисунок 32 – Результаты амплификации ДНК культуры 26

(Бифидобактерин) с родоспецифичными праймерами *Bifidobacterium spp.*

Культура 26 – положительный, ПК *Bifidobacterium spp.* – положительный,

ОКО – отрицательный

В результате из клинического материала было выделено 6 штаммов *Bifidobacterium spp.*, идентифицированных до рода, а также чистая культура *Bifidobacterium bifidum* из пробиотика Бифидобактерин (Б26).

Антагонистическую активность *Bifidobacterium spp.* определяли путем посева перпендикулярных штрихов условно-патогенных микроорганизмов. Для оценки антагонистической активности использовали микроорганизмы из пробирок №1,2,3,16,18,23,25,26 с положительным результатом ПЦР на *Bifidobacterium spp.* Чашки Петри подписывали соответственно номерам чистых культур *Bifidobacterium spp.* На всех чашках по центру по диаметру маркером и линейкой рисовали прямую линию. На поверхность агаризованной среды в чашке Петри засеивали штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антибактериальное вещество. Посев делали по диаметру чашки, которую затем помещали в термостат (эксикатор) при температуре, оптимальной для роста, 37°C на 24ч.

После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду, перпендикулярно к выросшему штриху, подсевали штрихами изоляты условно-патогенных микроорганизмов: *Escherichia coli* ФПМ 1, *Staphylococcus aureus* ФПМ 3, *Pseudomonas aeruginosa* ФПМ 4, *Enterococcus faecalis* ФПМ 7. (рисунок 32). Чашки поместили в термостат на 24 ч.

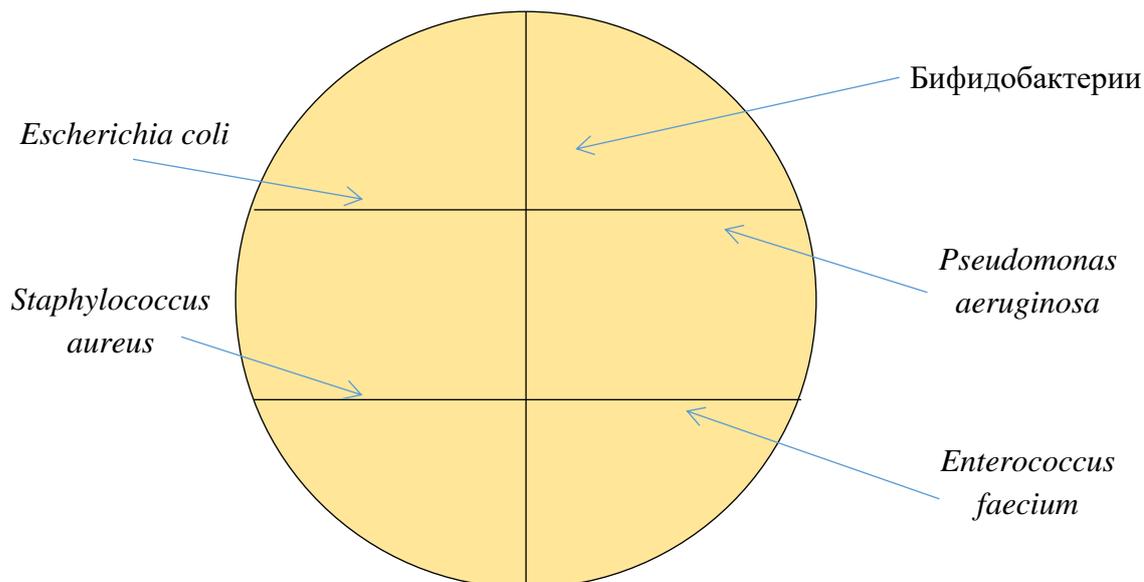


Рисунок 33 – Метод перпендикулярных штрихов

Если изучаемый микроорганизм антагонист образует диффундирующее в среду вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем более чувствительна тест-культура к продуцируемому антибиотическому веществу. Величина зоны отсутствия роста (в мм) указывает на степень активности данного штамма *Bifidobacterium spp.* в отношении индикаторных штаммов. Нечувствительные микроорганизмы будут развиваться в непосредственной близости от штриха (рисунок 34-40).



Рисунок 34. Культура Б1. Метод перпендикулярных штрихов.

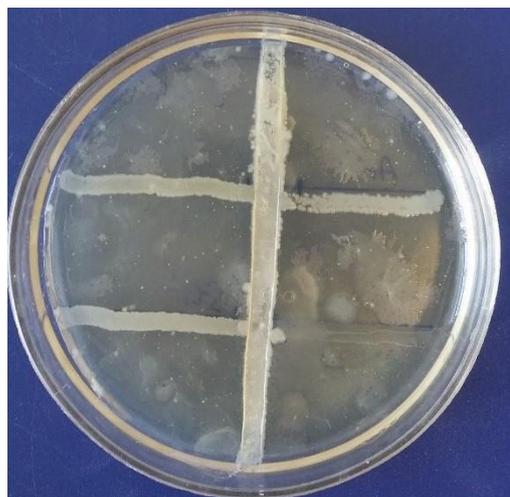


Рисунок 35. Культура Б2. Метод перпендикулярных штрихов.



Рисунок 36. Культура Б3. Метод перпендикулярных штрихов.

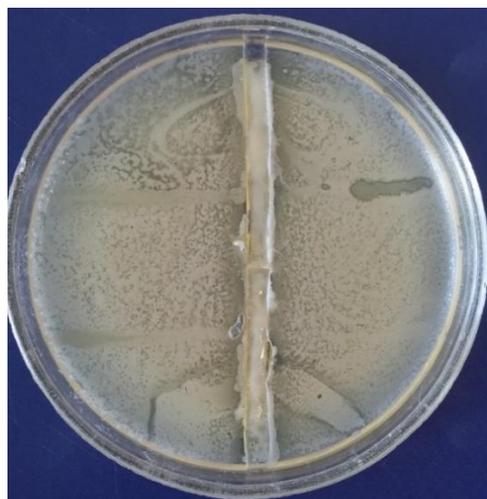


Рисунок 37. Культура Б16. Метод перпендикулярных штрихов.



Рисунок 38. Культура Б18. Метод перпендикулярных штрихов.



Рисунок 39. Культура Б23. Метод перпендикулярных штрихов.

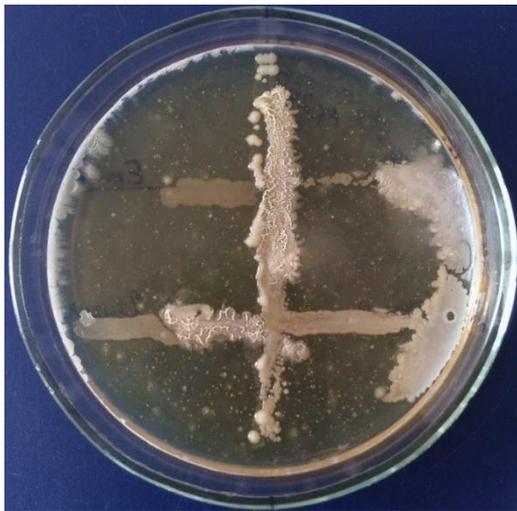


Рисунок 40. Культура Б26 (контрольный образец). Метод перпендикулярных штрихов.

Таблица 18 – Антагонистическая активность отдельных видов бифидобактерий

| № | <i>Escherichia coli</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | <i>Enterococcus faecium</i> | | | Сумма рангов |
|------|-------------------------|------------------------|------|------------------------------|------------------------|------|-------------------------------|------------------------|------|-----------------------------|------------------------|------|--------------|
| | Зона задержки роста, мм | Разница с контролем, % | Ранг | Зона задержки роста, мм | Разница с контролем, % | Ранг | Зона задержки роста, мм | Разница с контролем, % | Ранг | Зона задержки роста, мм | Разница с контролем, % | Ранг | |
| Б 1 | 7 | ↑ на 40% | 3 | 5** | ↓ на 78% | 3 | 5 | ↓ на 29% | 5 | 9** | ↑ на 200% | 2 | 13 |
| Б 2 | 3 | ↓ на 40% | 5 | 4** | ↓ на 83% | 4 | 6 | ↓ на 14% | 4 | 7** | ↑ на 133% | 3 | 16 |
| Б 3 | 10** | ↑ на 100% | 1 | 5** | ↓ на 78% | 3 | 6 | ↓ на 14% | 4 | 7** | ↑ на 133% | 3 | 11 |
| Б 16 | 3 | ↓ на 40% | 5 | 26 | ↑ на 13% | 1 | 20** | ↑ на 186% | 1 | 5* | ↑ на 67% | 4 | 11 |
| Б 18 | 8* | ↑ на 60% | 2 | 5** | ↓ на 78% | 3 | 10 | ↑ на 43% | 2 | 17** | ↑ на 467% | 1 | 8 |
| Б23 | 10** | ↑ на 100% | | 0 | | | 27** | ↑ на 285% | | 3 | = | | |
| Б 26 | 5 | | 4 | 23 | | 2 | 7 | | 3 | 3 | | 5 | 14 |

Примечание: * - статистически значимая разница $p < 0,05$ по сравнению с контролем;

** - статистически значимая разница $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

В результате проведенных исследований нами установлено, что все исследуемые бактерии рода *Bifidobacterium* по силе воздействия обладали различной активностью по отношению к условно-патогенным микроорганизмам (таблица 18).

Зона задержки роста культуры *Staphylococcus aureus* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *B. bifidum*, выделенного из Бифидобактерин, составила 23 мм. По влиянию на *Staphylococcus aureus* из тестируемых культур лидировала культура Б16: отмечалось отсутствие роста культуры 26 мм (больше на 13% по сравнению с контролем, статистически не значимо). Слабое (меньшее) антагонистическое действие по сравнению с контролем показали культуры Б1, Б2, Б3 и Б18, зона задержки роста составила 5 мм (меньше на 78%, $p < 0,01$), 4 мм (меньше на 83%, $p < 0,01$), 5 мм (меньше на 78%, $p < 0,01$) и 5 мм (меньше на 78%, $p < 0,01$) соответственно. Вследствие того, что культура Б23 не подавляет рост *Staphylococcus aureus*, решено исключить ее из дальнейшего статистического анализа.

Зона задержки роста культуры *Escherichia coli* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *B. bifidum*, выделенного из Бифидобактерин, составила 5 мм. По влиянию на *Escherichia coli* из тестируемых культур лидировала культура Б3: отмечалось отсутствие роста культуры 10 мм (больше на 100% по сравнению с контролем, $p < 0,01$). Культура Б18 также обладает высокой активностью в отношении кишечной палочки, зона задержки роста составила 8 мм (больше на 60% по сравнению с контролем, $p < 0,05$). Культура Б1 давала зону задержки роста 7 мм (больше на 40%), культуры Б2 и Б16 3 мм (меньше на 40%), т.е. их антагонистическая активность по отношению к *Escherichia coli* была равной контрольному образцу (различия статистически не значимы).

Зона задержки роста культуры *Pseudomonas aeruginosa* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *B. bifidum*, выделенного из Бифидобактерин, составила 7 мм. По влиянию на *Pseudomonas aeruginosa* из тестируемых культур лидировала культура Б16: отмечалось отсутствие роста культуры 20 мм (больше на 186% по сравнению с контролем, $p < 0,01$). Культура Б18 также обладает высокой активностью в отношении кишечной палочки, зона задержки роста составила 10 мм (больше на 43% по сравнению с контролем, статистически не значимо). Культура Б1 давала зону задержки роста 5 мм (меньше на 29%), культуры Б2 и Б3 6 мм (меньше 14%) т.е. их антагонистическая активность по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* была равной контрольному образцу (различия статистически не значимы).

Зона задержки роста культуры *Enterococcus faecium* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *B. bifidum*, выделенного из Бифидобактерин, составила 3 мм. Следует отметить, что все тестируемые культуры *Bifidobacterium spp.*, выделенные из клинического материала, проявляли антагонистическую активность по отношению к *Enterococcus faecium* значительно большую по сравнению с контрольным образцом – производственного штамма из пробиотика. При оценке действия бифидобактерий лидировала культура Б18. Культуры Б1, Б2 и Б3 также обладали высокой активностью ($p < 0,01$), культура Б16 ($p < 0,05$).

Далее для сравнения антагонистической активности была применена ранговая статистика, которая является функцией от рангов элементов, а не от их значений. Переход от значений к их рангам позволяет применить непараметрические критерии для оценки достоверности показателей исследований для несвязанных совокупностей. В нашем случае в каждом столбце, показывающего результаты по отношению к определенному условно-патогенному микроорганизму, данные ранжируются от большей величины к меньшей и определяется ранг значения от первого и т.д. Затем ранги суммируются в каждой строке определенного штамма бифидобактерий. По таблице оцениваются меньший из сумм по сравнению с контрольным штаммом (таблица 18).

По результатам ранговой статистики, наиболее выраженным антагонистическим действием обладали культуры Б18, Б16 и Б3, и Б1. Слабое антагонистическое действие по сравнению с контрольным препаратом показала культура Б2. Однако, культура Б1 по двум пунктам обладает меньшей активностью по сравнению с контролем, поэтому исключена из исследования. Культуры Б18 и Б3 обладают значительно меньшей активностью по отношению к *Staphylococcus aureus* в сравнении с контролем, что является важным недостатком, в то время как культура Б16 обладает антагонистической активностью равной с контролем.

Таким образом, в результате изучения антагонистической активности было отобрано 3 штамма бифидобактерий Б18, Б16 и Б3, проявивших антагонизм по отношению к микроорганизмам *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* активнее по сравнению с контрольным производственным штаммом *B. bifidum* от пробиотика «Бифидобактерин».

Выделенные культуры были идентифицированы генетическим методом ПЦР с видоспецифичными праймерами.

В результате идентификации трех антагонистически активных штаммов, выявлено, что штамм Б18 относится к виду *B. longum*, Б16 – к *B. bifidum*, Б3 – к *B. adolescentis* (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты ПЦР-идентификации

| Праймеры | Б3 | Б16 | Б18 | Б26 |
|-----------------------------|----|-----|-----|-----|
| <i>Bifidobacterium spp.</i> | + | + | + | + |
| <i>B. adolescentis</i> | + | – | – | – |
| <i>B. adolescentis 2</i> | + | – | – | – |
| <i>B. angulatum</i> | – | – | – | – |
| <i>B. animalis</i> | – | – | – | – |
| <i>B. bifidum</i> | – | + | – | + |
| <i>B. bifidum 2</i> | – | + | – | + |
| <i>B. breve</i> | – | – | – | – |
| <i>B. longum</i> | – | – | + | – |
| <i>B. longum 2</i> | – | – | + | – |
| <i>Lactobacillus spp.</i> | – | – | – | – |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовали влияние бактериофага на рост *Bifidobacterium spp.* Для этого анализ проводили на жидкой и плотной питательной средах «Бифидум-среда» с добавлением Пиобактериофага поливалентного очищенного и без. По окончании исследования было выявлено, что Пиобактериофаг не влияет и не подавляет рост *Bifidobacterium spp.* в обеих средах.

Проводили проверку наличия роста бактерий на ГРМ-бульоне и Бифидум-среде с добавлением Пиобактериофага поливалентного очищенного и без. Произошло подавление роста условно-патогенных микроорганизмов на указанных средах. По результатам проверки была получена модифицированная среда для *Bifidobacterium spp.* с Пиобактериофагом, которая имеет преимущество, так как на ней подавляется рост некоторых УПМ. Таким образом, были повышены селективные и ингибирующие свойства питательной среды.

Осуществляли получение антагонистически активных штаммов путем подсева накопительной культуры, выделения ДНК и постановки ПЦР в режиме реального времени. Производили посев *Bifidobacterium spp.* и условно-патогенных микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов. В качестве статистической обработки была использована ранговая статистика.

В результате проведенных исследований было установлено, что все исследуемые бактерии рода *Bifidobacterium* по силе воздействия обладали различной активностью по отношению к условно-патогенным микроорганизмам.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика выделения клинических культур бактерий рода *Bifidobacterium* на питательной среде с Пиобактериофагом, который обеспечивает селективные свойства питательной среды.

2. Проведена оценка активности *Bifidobacterium spp.* в отношении условно-патогенных микроорганизмов. Методом отсроченного антагонизма показано, что культуры Б1, Б2, Б3, Б16 и Б18 подавляют рост условно-патогенных микроорганизмов родов *Staphylococcus*, *Echerichia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, при этом штаммы Б3, Б16 и Б18 проявляют более выраженную антагонистическую активность.

3. Сформирована коллекция из 5 штаммов *Bifidobacterium spp.*, выделенных из клинического материала; 3 из которых обладают высокой антагонистической активностью.

4. В результате идентификации 3х антагонистически активных штаммов *Bifidobacterium* выявлено: штамм Б16 – *B. bifidum*, Б18 – *B. longum*, Б3 – *B. adolescentis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин А.В., Караулов А.В., Светоч Э.А. и др. Бактериофаги - пробиотические средства регуляции микробиоценозов и деконтаминации продуктов питания, животных и растений // Иммунол. аллергол.инфектол. – 2013. – №3: – С. 80-89.
2. Атабеков И.Г. Практикум по общей вирусологии: Учебное пособие / Под редакцией И.Г. Атабекова. – М.: Издательство МГУ, 2002. – 184с.
3. Бактериофаги [Электронный ресурс]. – М.: АО «НПО» «Микроген», 2005 – 2017. – Доступно из URL: [http://www.bacteriophage.ru / products/ piobacteriophage-polivalentnyy-ochishchennyy/](http://www.bacteriophage.ru/products/piobacteriophage-polivalentnyy-ochishchennyy/) [Дата обращения: 24 марта 2018].
4. Беляева Е.А. «Микробиота кишечника коренного жителя Центрального федерального округа РФ как основа для создания региональных пробиотических препаратов», Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, – Тверь, 2014. – 124с.
5. Бондаренко В.М. Клинический эффект и пути рационального использования лечебных бактериофагов в медицинской практике. // Фарматека. – 2011. – №1 (214): – С. 29-34.
6. Бондаренко В.М. Новые горизонты бактериофаготерапии. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал), –Москва, –2013.
7. Воробьев А.А. «Медицинская микробиология, вирусология и иммунология»: Учебник для студентов медицинских вузов / Под редакцией А.А. Воробьева. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. – 704 с.
8. Ворошилова Н.Н., Боговазова Г.Г., Казакова Т.Б. и др. Изучение клинической эффективности препаратов бактериофагов при лечении энтеральных и гнойно-воспалительных заболеваний. // Актуальные вопросы разработки и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов. – Уфа, – 2000. – С. 87-94.
9. Домотенко Л.В., Шепелин А.П. Бифидум-среда для выделения и культивирования бифидумбактерий. / Инфекция и иммунитет. – 2014. Т.4. – №3. – С. 279-283.
10. Зурабов А.Ю., Каркищенко Н.Н., Попов Д.В. и др. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов. Биомедицина. – 2012. – №1. – С. 134-138.
11. Иконникова Н.В. Бактериофаги – вирусы бактерий: учеб. пособие / – Минск: ИВЦ Минфина, – 2017. – 41с.

12. Карабелеш Е.Е., Ткаченко С.А., Панкратов С.М. и др. Применение бактериофагов как концепция лечебного и профилактического направления в медицине. // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2008. №1 (11). – С. 135-139.
13. Каттер Э., Сулаквелидзе А. (ред). Бактериофаги. Биология и практическое применение. Перевод с англ. – М.: Научный мир, 2012. –640с.
14. Корочинский А.В. Технологическая разработка иммобилизованных лекарственных форм с биоспорином и их исследования. Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. – Пятигорск, 2014. –145с.
15. Красильников И.В., Лобастова А.К., Лыско К.А. Краткий обзор современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебнопрофилактических препаратов бактериофагов. // Вестн. биотехнол. им. Ю.А. Овчинникова. – 2010. –№2. – С. 28-33.
16. Крылов В.Н. Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага: надежды, перспективы, проблемы безопасности, ограничения. // Генетика. 2001. №7. – С. 869-887.
17. Лахтин В.М. и др. / Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего // Вестник РАМН. – 2008. – № 2. – С. 33–44.
18. Мамедова Л.Н. Клинико-патогеническое обострение оптимизации диагностики и лечения воспалительных заболеваний кишечника. / Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. – Ростов-на-дону: РГМУ. – 2013. 27с.
19. Нетрусов А.И., Егоров М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов. – М.: Академия, 2005. –610с.
20. Поздеев О.К. «Медицинская микробиология»: Учебник для студ. мед. вузов / О. К. Поздеев; под редакцией В. И Покровского. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 768с.
21. Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003, утвержден приказом Минздрава России № 231 от 09.06.2003).
22. Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. / Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы. – 1991. – С. 81-159
23. Тикунова Н.В.; Власов В.В. Бактериофаги – враги наших врагов // Наука из первых рук. – 2013.
24. Харченко Н.В. «Выделение бифидобактерий и изучение их пробиотических свойств при длительном хранении», Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук 03.02.03 – микробиология, – Москва, 2016.

25. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. и др. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта // Тверь, 2016.
26. Щербенков И.М., Бактериофаги. Что мы знаем о них? Современные возможности фаготерапии в практике врача-педиатра. // Медицинский совет. – Москва, 2013.
27. Юнес Р.А. «Адаптивное значение для человека бактерий рода *Lactobacillus* и рода *Bifidobacterium*», Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук 03.02.08 – экология, 03.02.07 – генетика, – Москва, 2016.
28. Anderson K., Johansson A., Sheehan T. et al. Draft genome sequences of two *Bifidobacterium* sp. from the honey bee (*Apis mellifera*) // Gut Pathogen. –2013. – V.5. – P. 1-3.
29. Azeredo J., Sutherland I.W. The use of phages for the removal of infectious biofilms // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2008. – Vol. 9. – P. 261–266.
30. Barrett E., Ross R., Fitzgerald G. et al. Rapid screening method for analysing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73. – P. 2333-2337.
31. Biavati B., Mattarelli P., Dworkin M. et al. The Family Bifidobacteriaceae. The Prokaryotes. – 2006. – V.3. – P. 322–382.
32. Chen Y. Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for longterm storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. // J. Appl. Phycol. – 2003. – V.15. – P. 439-444.
33. Chen C.C., Walker W.A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states.// Advances in Pediatrics // 2005. №52. P. 77-113.
34. Culligan E.P., Hill C., Sleator R.D. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects // Gut Pathogens. – 2009. – 1:19 (12 pages). doi:10.1186/1757-4749-1-19. <http://www.gutpathogens.com/content/1/1/19>.
35. Dehnert J. Untersuchungen über die Gram positive Stuhlflora. // Brustmilchkinder. Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infectiionskr. –1957. – P. 66-79.
36. Deutsch S.-M. et al. Mur-LH, the Broad-Spectrum Endolysin of *Lactobacillus helveticus* Temperate Bacteriophage -0303 // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 96–103.
37. Donlan R.M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage // Trends Microbiol. – 2009. – Vol. 17. – P. 66–72.

38. Downes J., Mantzourani M., Beighton D. et al. *Scardovia wiggsiae* sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2011. – V.61. – P. 25-29
39. Egan M., O'Connell Motherrway M., Ventura M. Metabolism of sialic acid by *Bifidobacterium breve* UCC2003 // *App. Microbiol.* – 2014. – V.80. – P. 4414-4426.
40. Ewaschuk J.B., Diaz H., Meddings L. et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2008. – № 295. – P.1025-1034.
41. Felis, G.E. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria / G.E. Felis, F. Dellaglio // *Curr Issues Intest Microbiol.* – 2007. – Vol. 8. – № 2. – P. 44-61.
42. Geng-Feng F., Xi L., Ya-Yi H. et al. *Bifidobacterium longum* as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer // *Cancer Gene Therapy.* – 2005. – № 12. – P. 133-140.
43. Greenwood J., Pickett M. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. Nov // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1980. – V. 30. – P. 170-178.
44. Haiping L., Yan L., Wang J. et al. Fermentation characteristics of six probiotic strains in soymilk // *Annals Of Microbiology.* – 2012.
45. Holland D. Generic index of the commoner forms of bacteria // *J. Bacteriol.* – 1920. – V.5. – P. 191-299.
46. Huys G., Vancanneyt M., D'haene K. et al. *Alloscardovia omnicolens* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – V. 57. – P. 1442-1446.
47. Imaoka A., Shima T., Kato K. et al. Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells // *World J Gastroenterol.* – 2008. – Apr 28. – № 14 (16). – P. 2511 - 2516.
48. Ivec M., Botić T., Koren S. et al. Interactions of macrophages with probiotic bacteria lead to increased antiviral response against vesicular stomatitis virus // *Antiviral Res.* – 2007. – № 75. – P. 266 - 274.
49. Jian W., Dong X. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V.52. – P. 809-812.

50. Khaskheli G., Zuo F., Yu R. et al. Everexpression of small heat shock protein enhances heat- and salt-stress tolerance of *Bifidobacterium longum* NCC2705 // *Curr. Microbiol.* – 2015. – V.71. – P. 8-15.
51. Kim N., Kunisawa J., Kweon M.N. et al. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4(+) CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation // *Clin Immunol.* – 2007. – Apr. – № 123 (1). – P. 30-39.
52. Klijn A., Mercenier A., Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. // *FEMS Microbiol.* – 2005. – V.29. – P. 491-509.
53. Letkiewicz S. et al. The perspectives of the application of phage therapy in chronic bacterial prostatitis // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 99-112.
54. Li J.L., Jiang W., Xia Q. et al. HPV E6 down-regulation and apoptosis induction of human cervical cancer cells by a novel lipid-soluble extract (PE) from *Pinellia pedatisecta* Schott in vitro // *J Ethnopharmacol.* – 2010. – № 132. – P. 56 – 64.
55. Marsalek B., Rojickova-Padrtova R. Long-term maintenance of alga strains for use in biomassays and biotechnology. // *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* – 1988. – V. 124. – P. 121-136.
56. Matsuzaki S., Rashed M., Uchiyama J. et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases // *J Infect Chemother.* – 2005. – № 11(5). – P. 211-219.
57. Meile L., Rohr L., Geissmann T. et al. Characterization of the D-xylulose-5-phosphate/D-fructose-6-phosphatephosphoketolase gene (xfp) from *Bifidobacterium lactis*. // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183. – P. 2929-2936.
58. Milani C., Duranti S., Lugli G. et al. Comparative genomics of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* reveals a strict monophyletic bifidobacterial taxon // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79. – P. 4304-4315.
59. Min-Kyeong C., Do-Kyung L., Hyang-Mi A. et al. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM1005-A on human papillomavirus type 16 // *BMC Medicine.* – 2012. – № 10. – P. 72.
60. Mitsuoka T. Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals // *Zentral Bacteriol. Parasitenkd. Infectionskr.* – 1969. – P. 52-64.
61. Moreno Muñoz J.A., Chenoll E., Casinos B. et al. Novel Probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 Strain Active against Rotavirus Infections // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – № 24. – P. 8775 - 8783.

62. Nebra Y., Blanch A.R. A New Selective Medium for Bifidobacterium. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 5173-5176.
63. Oberg Ts., Ward R.E., Broadbent J.R. Genetic and physiological responses of Bifidobacterium animalis subsp. lactis to hydrogen peroxide stress. // J.Bacteriol. – 2013. – V. 195. – P. 3743-3751.
64. Okamoto M., Benno Y., Leung K.P. et al. Bifidobacterium tsurumiense sp. nov., from hamster dental plaque // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – V.58. – P. 144-148
65. Orla-Jensen S. Classification des bactéries lactiques // Lait. – 1924. – P. 468-474.
66. Poncet J., Benort V. Cryopreservation of the unicellular marine alga, Nannochloropsis oculata. // Biotechnol. Lett. – 2003. – V.25. I. 23. – P. 2017-2022.
67. Poupard J., Husain I., Norris R. Biology of the bifidobacteria // Bacteriol. Rev. – 1973. – V.37. – P. 136-165.
68. Prasanna P, Grandison A., Charalampopoulos D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits // Food Res. Int. – 2014. – V. 55. – P. 247-262.
69. Reuter G., Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl // Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. – 1963. – V.191. – P. 486-507.
70. Ruas-Madiedo P., Hernández-Barranco A., Margolles A., de los Reyes-Gavilán C. A bile salt-resistant derivative of Bifidobacterium animalis has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose. // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V.71. – P. 6564-6570.
71. Sánchez B., Champomier-Vergès M.-C., Collado M. del C. et al. Low pH adaptation and the acid tolerance response of Bifidobacterium longum biotype longum. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73. – P. 6450-6459.
72. Scardovi V., Trovatelli L.D. New species of bifidobacteria from apis mellifica L. and apis indica F. a contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus Bifidobacterium. // Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II. – 1969. – V.123. – P. 64-88
73. Silva A.M., Barbosa F.H., Duarte R. et al. Effect of Bifidobacterium longum ingestion on experimental salmonellosis in mice // J Appl Microbiol. – 2004. – № 97. – P. 29 - 37.

74. Simpson P.J., Ross R.P., Fitzgerald G.F. et al. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – V. 54. – P. 401-406.
75. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Vorris J.G. Bacteriophage therapy (mini review) // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – № 45 (3) – P. 649-659.
76. Talwalkal A., Kailasapathy K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L.acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. // *Curr. Issues Intest. Micribiol.* – 2004. – V.5. – P. 1-8.
77. Tang W., He Y., Zhou S. et al. A novel *Bifidobacterium infantis*-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* – 2009. – № 28. – P. 155.
78. Thacker P.D. Set a microbe to kill a microbe: drug resistance renews interest in phage therapy // *JAMA.* – 2003. – № 290 (24). – P. 3183-3185.
79. Tharmaraj N. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. // *J. Dairy Sci.* – 2003. – V. 86. – P. 2288-2296.
80. Uelivon A., Mozetti V., Lacroix C. et al. Classification of a moderately oxygen-tolerant isolate from babyfaeces as *Bifidobacterium thermophilum* // *BMC Microbiol.* – 2007. – V.7. – P. 171-180.
81. Uzunova-Doneva T. Anabiosis and conservation of microorganisms. // *J. of Culture Collection.* – 2005. – V.4. – P. 17-28.
82. Ventura, M., Canchaya C., Tauch A. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* – 2007. – V.71. – P. 495-548.
83. Wang K.Y., Li S.N., Liu C.S. et al. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori* // *Am J Clin Nutr.* – 2004. – № 80. – P. 737 - 741.
84. Winslow C.E.A., Broadhurst J., Buchanan R.E. et al. The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types // *J. Bacteriol.* – 1917. – V. 2. – P. 505-566.

85. Woodman C.B., Collins S., Winter H. et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study // *Lancet*. – 2001. – № 357. – P. 1831 - 1836.
86. Yazawa K., Imani K., Tamuza Z. Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria. // *Chem. Pharm. Bull.* – 1978. – V. 26. – P. 3306-3311.
87. Yin Ya-Ni., Yu Q., Fu N. et al. Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats // *World J Gastroenterol.* – 2010. – July 21. – № 16 (27). – P. 3394 - 3401.
88. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation // *Microbiol Rev.* – 1992. – № 56 (3). – P. 430-481.
89. Zarate S., Lopez-Leiva M.H. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. // *J. Food Prot.* – 1990. – V. 53. – P. 262-268.
90. Zinedine, A. Isolation and Characterization of Strains of Bifidobacteria with Probiotic proprieties In vitro / A. Zinedine, M. Faid // *World Journal of Dairy & Food Sciences.* – 2007. – № 2 (1). – P. 28-34.
91. Zouhir A., Kheadr E., Fliss I. et al. Partial purification and characterization of two bacteriocin-like inhibitory substances produced by bifidobacteria // *African Journal of Microbiology Research.* – 2011. – V. 5 (4). – P. 411-418.
92. Zhihong S., Wenyi Z., Chenyi G. et al. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: A snapshot of its genetic diversity and evolution. // *PLoS ONE.* – 2015. – V. 10. – P. 576-593.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Динова Регина Камилевна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *BIFIDOBACTERIUM SPP.* С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ».

Представленная работа посвящена разработке методики выделения клинических культур бактерий рода *Bifidobacterium* на питательной среде с Пиобактериофагом, который обеспечивают селективные свойства. В результате сформирована коллекция из пяти штаммов *Bifidobacterium spp.*, три из которых обладают высокой антагонистической активностью.

За время обучения в БГМУ Динова Р.К. освоила учебную программу в полном объеме. Все годы училась только на «хорошо» и «отлично», совмещая учебу с научной работой в молодежном научном кружке.

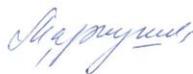
В процессе выполнения ВКР Динова Р.К. успешно овладела основными микробиологическими методами исследования, освоила методики ПЦР в режиме реального времени и работы с бактериофагами.

Полученные в ходе выполнения результаты апробированы и представлены в публикациях и в виде устных сообщений на конференциях (БГМУ–2018, Ломоносов–2018), результаты отмечены Дипломом за лучший доклад, данные оформлены в виде Патента РФ на изобретение.

В ходе выполнения ВКР Динова Р.К. проявила ответственность, исполнительность, навыки самостоятельной работы и компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Выпускная квалификационная работа Диновой Регины Камилевны **ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ** и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



Т.В. Маркушева

ОТЗЫВ

внешнего рецензента кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника УИБ УФИЦ РАН Гильвановой Елены Альбертовны на выпускную квалификационную работу Диновой Регины Камилевны «СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *BIFIDOBACTERIUM SPP.* С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ»

Актуальность темы исследования.

В настоящее время для профилактики и лечения дисбактериоза желудочно-кишечного тракта широко применяются пробиотики. Наиболее перспективными среди них являются бактерии рода *Bifidobacterium*, обладающие высокой биологической и функциональной активностью. Бифидобактерии используются на практике как в качестве пробиотиков, так и в производстве пищевых продуктов. Известно, что биологическая активность пробиотиков может снижаться, поэтому периодически встает необходимость поиска новых штаммов-кандидатов в пробиотики.

Для получения аутоштаммов необходимо выделить чистые культуры бактерий рода из клинического материала (фекалий, вагинального отделяемого) на селективной питательной среде. Однако при посеве клинического материала и его культивировании происходит обильное размножение сопутствующей аэробной и факультативно-анаэробной микрофлоры, что приводит к угнетению роста бактерий рода *Bifidobacterium*, делает невозможным их накопление в питательной среде, а при высеве со среды накопления на плотную селективную питательную среду колонии бактерии рода *Bifidobacterium* не вырастают. Разработка, с одной стороны, простого, а с другой – надежного метода культивирования бифидобактерий является одним из приоритетных направлений прикладной микробиологии.

ВКР посвящена теоретическому обоснованию и экспериментальной разработке методики получения чистых культур бактерий рода *Bifidobacterium* на питательной среде с добавлением Пиобактериофага, в качестве селективного агента.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Выделены перспективные штаммы бифидобактерий, обладающие высокой антагонистической активностью для дальнейшего конструирования пробиотических препаратов и использования их в медицине и пищевой промышленности.

Значение полученных результатов исследования для практики подтверждается оформлением патента РФ на изобретение (справка о приоритете №2018114180 от 17.04.2018 г.).

Достоверность и апробация результатов исследования.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, состоит в непосредственном участии во всех этапах процесса. ВКР является результатом самостоятельной работы автора от обоснования актуальности, постановки цели и задач исследования до проведения статистической обработки, анализа полученных данных и формулировки выводов. Автором выполнялась аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов, подготовка текстовой и иллюстративной части работы. Достоверность результатов не вызывает сомнений, поскольку работа выполнена на достаточном клиническом материале с использованием микробиологических и молекулярно-генетических исследований. Достоверность результатов исследования подтверждается таблицами, рисунками и данными статистической обработки.

Основные положения работы доложены на XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (г. Москва, 9-13 апреля 2018 г.) и 83-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (г. Уфа, 23 апреля 2018 г.).

Материалы выпускной квалификационной работы отражены в 3 научных работах.

Оценка содержания, завершенности и оформления ВКР.

Автором был проанализирован большой объем теоретического материала, для написания проекта использованы научные работы отечественных и зарубежных авторов, проблема раскрыта всесторонне с разных точек зрения. Весь собранный материал изложен четко, последовательно, с соблюдением внутренней логики повествования. Практическое исследование проведено на достаточно высоком методологическом и теоретическом уровнях. Прослеживается тщательная и глубокая проработка каждого вопроса. Содержание данной дипломной работы полностью соответствует первоначальному заданию и отвечает всем необходимым требованиям. Выбранная проблематика раскрыта полно и всесторонне, цель достигнута, задачи решены, выводы обоснованы, рекомендации и предложения имеют большую практическую значимость.

Соответствие направлению подготовки.

ВКР соответствует направлению подготовки 06.03.01 – Биология.

Заключение. Выпускная квалификационная работа Диновой Регины Камилевны «СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *BIFIDOBACTERIUM SPP.* С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Маркушевой Татьяны Вячеславовны является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат).

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Уфимского Института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (Адрес: 450054, г.Уфа, проспект Октября, 69, Тел./Факс: (347)235-57-68; E-mail: ib@anrb.ru



Гильванова Елена Альбертовна

Подпись: *Гильванова*
 Заверяю: *С.В.Кост*
 Инспектор по кадрам: *Кост С.В.*



Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

**Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ**

| | |
|-------------------------------------|---|
| Автор работы | Динова Регина Камилевна |
| Факультет, кафедра, номер группы | Б 401 А |
| Тип работы | Дипломная работа |
| Название работы | Динова Диплом |
| | |
| Название файла | Динова Диплом.docx |
| Процент заимствования | 17,36% |
| Процент цитирования | 3,21% |
| Процент оригинальности | 79,43% |
| Дата проверки | 10:42:15 22 июня 2018г. |
| Модули поиска | Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ" |

Работу проверил Кобзева Наталья Рудольфовна
ФИО проверяющего

Дата подписи 22.06.2018

С.В.У.
Подпись проверяющего

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система определяет автоматически проверяющего. Представленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.