

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-1-90-101

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТАКСОНОМИИ, МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВАХ БИФИДОБАКТЕРИЙ

ЗАХАРОВА Ю.В., ЛЕВАНОВА Л.А.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России,
г. Кемерово, Россия

LECTURE

CURRENT OPINION ON TAXONOMY, MORPHOLOGICAL, AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF BIFIDOBACTERIA

YULIYA V. ZAKHAROVA, LYUDMILA A. LEVANOVA

Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056), Kemerovo, Russian Federation

Резюме

В лекции представлены современные сведения по систематике бифидобактерий, основанные на комбинированном принципе таксономии, включающем фенотипические, генотипические и филогенетические характеристики бактерий. Приведены данные о новых и рекласифицированных видах и подвидах бифидобактерий. Дана характеристика состава и общих признаков представителей семейства *Bifidobacteriaceae*. Описаны морфология, особенности строения клеточной стенки бифидобактерий, современные данные о геноме и внехромосомных факторах наследственности. Уделено вни-

мание пилеподобным структурам как основным факторам адгезии, их строению, условиям и интенсивности образования у разных видов бифидобактерий. Показана роль некоторых сахаролитических ферментов бифидобактерий в адгезивном процессе. Представлены данные по физиологии бифидобактерий, в том числе особенностям метаболизма, ключевых ферментах, участвующих в сбраживании гексоз, описаны источники питания и условия роста, о чувствительности бифидобактерий к кислороду и их экологии.

Ключевые слова: бифидобактерии, таксономия, морфология, метаболизм, экология.

English ►

Abstract

Here we present current information on the taxonomy of bifidobacteria, which is based on their phenotypic, genetic and phylogenetic characteristics. We also provide the data on newly discovered and reclassified species and subspecies of bifidobacteria. Furthermore, we consider the composition of the *Bifidobacteriaceae* family. This lecture summarizes the general data on morphology, cell wall structure, genome, and

extrachromosomal inheritance in bifidobacteria. Particular attention is given to pili-like structures and saccharolytic enzymes responsible for adhesion. We then review key energy sources of bifidobacteria, their growth conditions, and specific enzymes involved in the fermentation of hexoses. Finally, we discuss ecological aspects related to bifidobacteria.

Keywords: bifidobacteria, taxonomy, morphology, metabolism, ecology.

Введение

В настоящее время бифидобактерии все чаще привлекают внимание исследователей и

врачей различных специальностей. Это связано с тем, что бифидобактерии, являясь облигатными представителями нормальной микрофлоры

толстого кишечника, выполняют многочисленные функции, направленные на поддержание и сохранение здоровья человека. Кроме того, бифидобактерии широко используются в качестве микроорганизмов, являющихся основой для изготовления пробиотических препаратов, биологически активных добавок и продуктов функционального питания, показания к применению которых все время расширяются. Однако в последние годы появляются отдельные сведения об участии бифидобактерий в патологических процессах, таких как, кариес, септические состояния у иммунодефицитных больных, что свидетельствует о том, что даже индигенная микрофлора при определенных состояниях может проявлять оппортунистические свойства.

Несмотря на то, что бифидобактерии были открыты еще в конце 19 века, сведения о них достаточно немногочисленны и противоречивы. Поэтому становится важным систематизировать и актуализировать данные по биологии и экологии бифидобактерий с учетом достижений отечественных и зарубежных исследователей.

Филогения и таксономическое положение бифидобактерий

Бифидобактерии впервые были обнаружены в 1899 году Tissier, который называл их “палочка бифидо”. В начале 20 века, учитывая сходство бифидобактерий с лактобактериями, согласно 7-му изданию «Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology», они были включены в род *Lactobacterium*. В 8-м издании руководства Берги бифидобактерии были уже выделены в отдельный род *Bifidobacterium*, название которого было первоначально предложено Orla-Jensen в 1924 году [1]. Род включал восемь видов и был отнесен в семейство *Actinomycetaceae*, порядка *Actinomycetales*, хотя строение пептидогликана клеточной стенки бифидобактерий больше было похоже на пептидогликан микроорганизмов семейства *Lactobacillaceae*.

В 1980 году применение молекулярно-генетических методов анализа последовательности генов р-РНК подтвердило принадлежность бифидобактерий к группе «Актиномицетов». В настоящее время использование молекулярно-генетических методов позволило определить и уточнить таксономическое положение и классификацию различных представителей нормальной микрофлоры, в том числе и бифидобактерий. Для исследования таксономии рода *Bifidobacterium* была использована поли-

меразно-цепная реакция (ПЦР) с видоспецифическими праймерами для генов 16S рРНК, выявляющих консервативные нуклеотидные последовательности [1]. При этом идентификация видов бифидобактерий даже с помощью молекулярно-генетических методов считается проблематичной в связи с присущей им генотипической гетерогенностью [1, 2]. Интеграция и анализ данных по фенотипическим, генотипическим и филогенетическим характеристикам, получившие название полифазной или комбинированной таксономии, упорядочили номенклатуру и систематизацию представителей рода *Bifidobacterium*, реклассифицировав многие виды бифидобактерий [1].

Бифидобактерии относят к домену *Bacteria*, типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*, порядку *Bifidobacteriales*, семейству *Bifidobacteriaceae*, роду *Bifidobacterium* [1, 2]. В составе рода *Bifidobacterium* насчитывают более 40 видов (таблица 1).

В настоящее время номенклатура и систематизация представителей рода *Bifidobacterium* не закончены и осуществляются в нескольких направлениях: выявляются и описываются новые виды, реклассифицируются уже существующие, в том числе и производственные штаммы [1, 3].

Общая характеристика семейства *Bifidobacteriaceae*

Семейство *Bifidobacteriaceae* включает роды *Bifidobacterium* (более 45 видов на 2016 год), *Alloscardovia* (один вид), *Aeriscardovia* (один вид), *Metiscardovia* (один вид), *Parascardovia* (один вид), *Scardovia* (один вид), которые являются близкими филогенетическими соседями, и род *Gardnerella* (один вид) [1].

Представители этого семейства представляют собой полиморфные палочки, расположенные поодиночке или образующие одноклеточные цепочки или скопления. Бактерии не имеют капсулы, не образуют спор, неподвижные и не ветвятся, в окраске по Граму – грамположительны, кроме гарднерелл, которые окрашиваются грамвариабельно. Большинство представителей семейства *Bifidobacteriaceae* являются анаэробами. Среди бифидобактерий некоторые виды аэротолерантны к кислороду, а *B. psychraerophilum*, *B. scardovii*, и *B. tsurumiense* могут расти в аэробных условиях. Микроорганизмы рода *Gardnerella* имеют факультативно анаэробный тип дыхания, представители рода *Aeriscardovia* могут расти в аэробных условиях.

Таблица 1.
Виды и подвиды
бифидобактерий

Table 1.
Species and
subspecies of
bifidobacteria

Название вида или подвида <i>Species or subspecies</i>	Авторы <i>Authors</i>	Год выделения и реклассификации <i>Year of discovery and reclassification</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> , species	Tissier	1900
	Orla-Jensen	1924
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , species	Reuter	1963
<i>Bifidobacterium breve</i> , species	Reuter	1963
<i>Bifidobacterium animalis</i> , species	Mitsuoka	1969
	Scardovi and Trovatelli	1974
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> subsp. nov.	Mitsuoka	1969
	Masco et al.	2004
<i>Bifidobacterium asteroides</i> , species	Scardovi and Trovatelli	1969
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> corrig., species.	Mitsuoka	1969
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> , species.	Mitsuoka	1969
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> , subsp. nov.	Mitsuoka	1969
	Yaeshima et al.	1992
<i>Bifidobacterium coryneforme</i> species nov., nom. rev.	Scardovi and Trovatelli	1969
	Biavati et al.	1982
<i>Bifidobacterium suis</i> , species	Matteuzzi et al.	1971
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> , species	Scardovi and Crociani	1974
<i>Bifidobacterium pullorum</i> , species	Trovatelli et al.	1974
<i>Bifidobacterium angulatum</i> , species	Scardovi and Crociani	1974
<i>Bifidobacterium boum</i> , species	Scardovi et al.	1979
<i>Bifidobacterium choerinum</i> , species	Scardovi et al.	1979
<i>Bifidobacterium cuniculi</i> , species	Scardovi et al.	1979
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> , species	Scardovi et al.	1979
<i>Bifidobacterium subtile</i> , species nov.	Biavati et al.	1982
<i>Bifidobacterium minimum</i> , species nov.	Biavati et al.	1982
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> , comb. nov.	Biavati et al.	1982
	Yaeshima et al.	1992
<i>Bifidobacterium merycicum</i> , species nov.	Biavati and Mattarelli	1991
<i>Bifidobacterium ruminantium</i> , species nov.	Biavati and Mattarelli	1991
<i>Bifidobacterium saeculare</i> , species nov.	Biavati et al.	1992
<i>Bifidobacterium denticolens</i> , species nov.	Crociani et al.	1996
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , comb. nov.	Meile et al.	1997
	Masco et al.	2004
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> , species nov.	Dong et al.	2000
<i>Bifidobacterium scardovii</i> , species nov.	Hoyles et al.	2002
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> , subsp. nov.	Zhu et al.	2003
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i> , subsp. nov.	Dong et al.	2000
	Zhu et al.	2003
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> , species nov.	Simpson et al.	2004
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i> , species nov.	Okamoto et al.	2008
<i>Bifidobacterium bombi</i> , species nov.	Killer et al.	2009
<i>Bifidobacterium mongoliense</i> , species nov.	Watanabe et al.	2009
<i>Bifidobacterium stercoris</i> , species nov.	Kim et al.	2010
<i>Bifidobacterium bohemicum</i> , species nov.	Killer et al.	2011
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i> , species nov.	Killer et al.	2011
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i> , species nov.	Endo et al.	2012
<i>Bifidobacterium biavatii</i> , species nov.	Endo et al.	2012
<i>Bifidobacterium saguini</i> , species nov.	Endo et al.	2012
<i>Bifidobacterium callitrichos</i> , species nov.	Endo et al.	2012
<i>Bifidobacterium reuteri</i> , species nov.	Endo et al.	2012
<i>Bifidobacterium crudilactis</i> , species nov.	Delcenserie et al.	2013
<i>Bifidobacterium moukalabense</i> , species nov.	Tsuchida et al.	2014
<i>Bifidobacterium aesculapii</i> , species nov.	Modesto et al.	2014

Представители семейства не гидролизуют желатин, не продуцируют индол, не имеют оксидазы, но обладают фруктоза-6-фосфокетотлазой, которая расщепляет фруктозо-6-фосфат до ацетилфосфата и эритрозо-4-фосфата. Содержание G+C пар в ДНК колеблется от 42 до 67

мол.%. Они хемоорганотрофы, имеющие ферментативный тип метаболизма, и разлагают различные углеводы до кислоты, без образования газа. Оптимальная температура роста составляет 30-39°C [1]. Типовой род: *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924).

Морфология и ультраструктура бифидобактерий

Представители рода *Bifidobacterium* являются палочками, размером 0,5-1,3×1,5-8 мкм. Они обычно несколько изогнуты, имеют разветвления в виде Y- или V-формы, с булабовидными вздутиями на концах. Иногда встречаются раздутые кокковидные формы. В мазках клетки располагаются одиночно, парами, иногда цепочками, палисадом или розетками. Грамположительные, окрашивание часто неравномерное, не образуют спор, неподвижны. Микроскопическая картина каждого вида бифидобактерий имеет особенности по размеру, форме и расположению клеток [1, 4].

Наиболее часто встречающиеся морфологические формы среди бифидобактерий представлены на **рисунке 1**.

Морфология бифидобактерий зависит от условий культивирования. При выращивании бифидобактерий на печеночном агаре или в молоке ветвление исчезает, появляется много гранулированных форм, которые иногда можно принять за кокки, клетки становятся грамвариабельными. Ветвление чаще происходит в среде, неполноценной в отношении источников питания. Появление полиморфных клеток у бифидобактерий индуцируется ионами металлов (калия, натрия, лития, цезия), а также исключением из среды культивирования одной из четырех аминокислот (аланина, серина, аспарагиновой кислоты, L(+)-глутаминовой кислоты). Среди штаммов, выделенных из кишечника взрослых людей, преобладают палочковидные и булабовидные формы; ветвящиеся палочки чаще встречаются у детей грудного возраста. На ранних стадиях развития у бифидобактерий преобладают палочковидные формы, а при дальнейшем культивировании образуются разветвленные нити с многочисленными перегородками в основном стволе и ответвлениях [1, 4].

В клеточных стенках бифидобактерий содержится значительное количество полисахаридов, как правило, галактоза, глюкоза с рамнозой [1]. О наличии липотейхоевых кислот, которые не разрушаются после применения лизоцима, стало известно в 1983 году. Иммунохимические исследования показали, что липотейхоевые кислоты являются общим антигеном в пределах рода *Bifidobacterium*. Кроме того, белки и липотейхоевые кислоты обуславливают самостоятельно либо в составе динамических комплексов гидрофобный характер

поверхности бифидобактерий [5]. Поверхностные белковые компоненты участвуют в адгезии бифидобактерий [5, 6]. Изучение клеточных структур (липотейхоевых кислот, белков) и взаимодействие клеток с субстратом необходимы для понимания механизмов, которые регулируют бактериальную адгезию и, следовательно, колонизацию.

Фосфолипидный состав клеточной стенки некоторых бифидобактерий был изучен еще в 1971 году. Различия в составе полиглицерина фосфолипидов и аминокислот фосфатидилглицерола помог различить два рода. Изменения состава поверхностных бактериальных липидов в процессе роста на желчесодержащих средах позволило говорить, что липидная композиция напрямую влияет на адгезивные свойства бифидофлоры [6, 7].

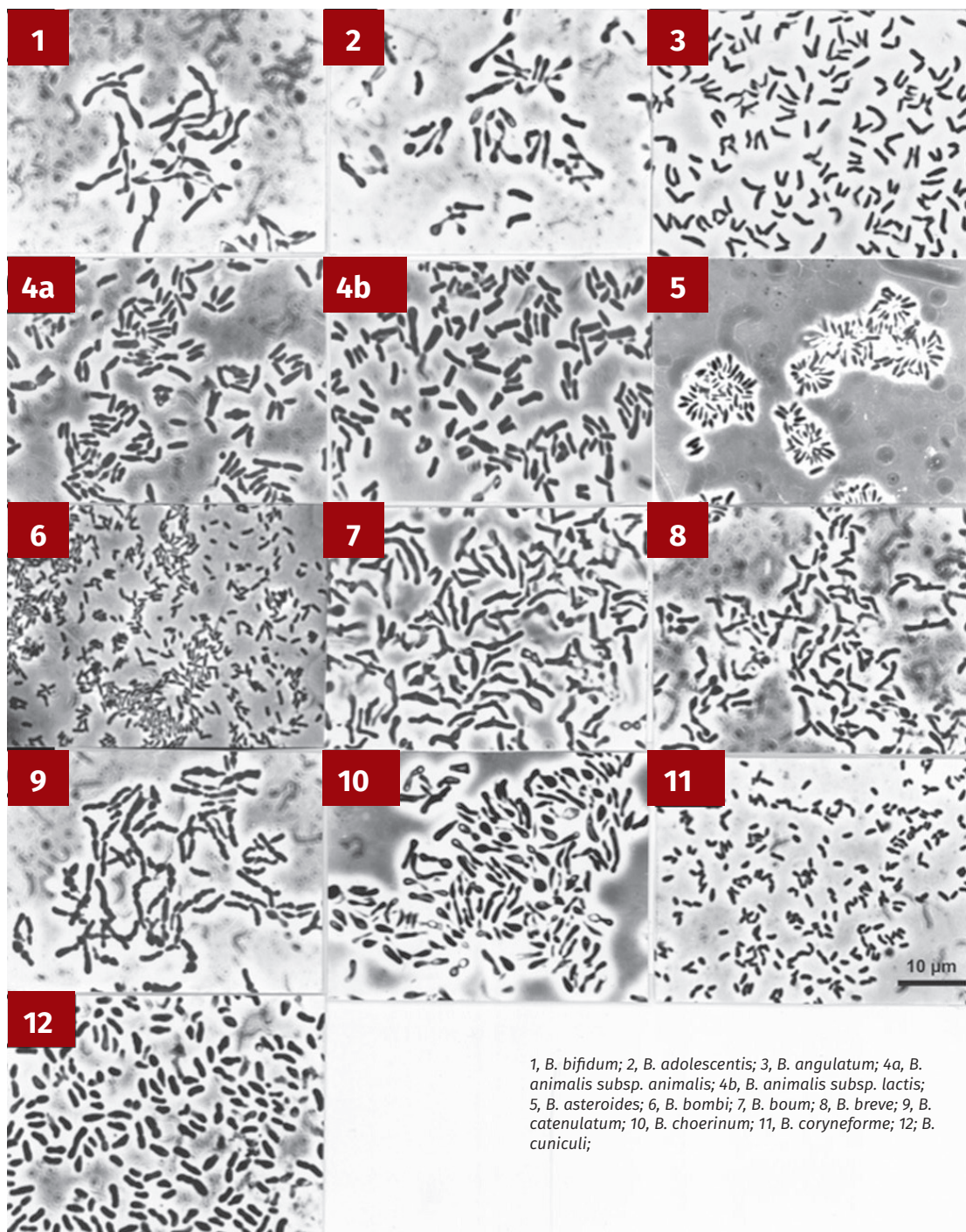
В настоящее время изучено большое число факторов адгезии бифидобактерий [6]. Так, с помощью атомно-силовой микроскопии у бифидобактерий выявлено наличие пилеподобных структур. Выросты, напоминающие пили, обнаружены у штаммов *B. bifidum*, *B. longum subsp. longum*, *B. dentium*, *B. adolescentis* и *B. animalis subsp. lactis*. Ворсинки бифидобактерий организованы как у большинства грамположительных бактерий и характеризуются ковалентной полимеризацией субъединиц пилина, которая осуществляется посредством транспептидазного фермента сортазы [8].

В секвенированных геномах *B. dentium*, *B. longum subsp. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, и *B. animalis subsp. lactis* обнаружены гены, кодирующие субъединицы пилина и сортазы. Однако эти гены отсутствуют в геноме *B. longum subsp. infantis*. Наибольшее количество генов, кодирующих пили, идентифицировано в геноме *B. dentium*, поэтому данный микроорганизм обладает широким адаптивным потенциалом и обнаруживается в разных экологических нишах [8, 9].

Кроме пилеподобных структур у бифидобактерий присутствуют и афимбриальные факторы адгезии [6]. Это поверхностно-связанные белки с ферментативной активностью, опосредующие колонизацию кишечника человека через деградацию внеклеточного матрикса. Анализ протеинов *B. bifidum* с помощью масс-спектрометрии позволил идентифицировать в качестве адгезина фермент трансальдозазу. Этот фермент участвует в пентозофосфатном пути и отвечает за конверсию фруктозо-6-фосфата и

Рисунок 1.
Морфология
различных видов
рода *Bifidobacterium*.
Фазово-контрастные
микрофотографии
(увеличение 1500×)

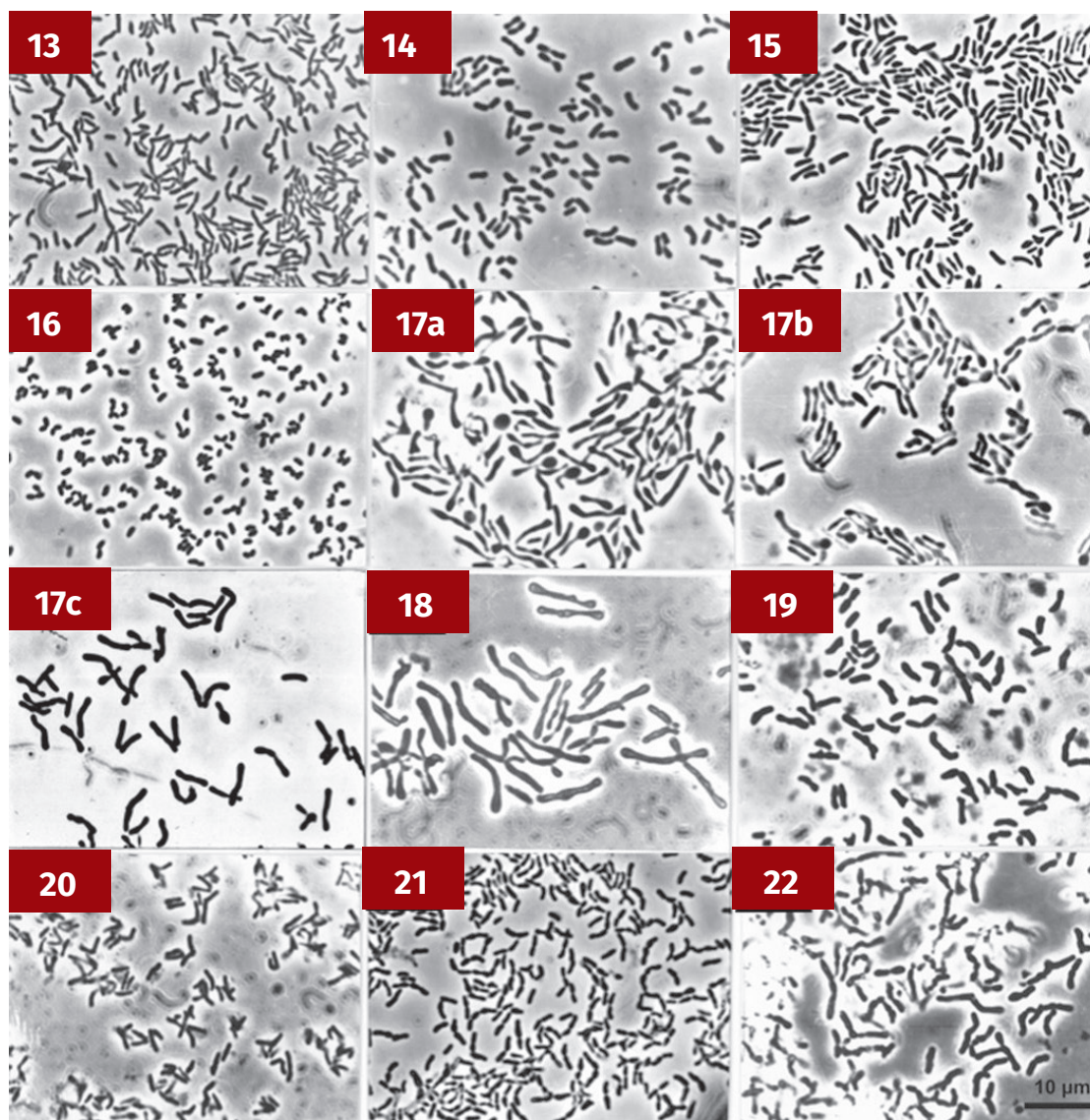
Figure 1.
Morphology of various
Bifidobacterium
species. Phase-
contrast microscopy,
x1500 magnification



эритрозо-4-фосфата в седогептулозу-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат, позднее включаемый в гликолиз. Хотя фермент расположен на цитоплазматической мембране, у нескольких видов бифидобактерий он обнаружен во внеклеточном пространстве или на поверхности бактериальной клетки [1]. Установлена связь между адгезией к муцину и аутоагрегацией бифидофлоры. Аутоагрегация играет важную роль в выживаемости бактерий при транзите по желудочно-кишечному тракту, обеспечивая возможность колонизации, как минимум, тон-

кого кишечника. Агрегативный фенотип пробиотических бактерий может также обеспечивать их коагрегацию с патогенными микроорганизмами, тем самым способствуя выведению возбудителя из разных отделов желудочно-кишечного тракта и уменьшению их вирулентности [1, 6, 10].

Еще одним белком-ферментом из группы сахаролитических, участвующим в адгезии бифидобактерий, является енолаза. Енолаза обеспечивает формирование фосфоенолпирувата из 2-фосфоглицерата. Этот белок имеет сред-



13, *B. dentium*; 14, *B. gallicum*; 15, *B. gallinarum*; 16, *B. indicum*;
17a, *B. longum* subsp. *longum*; 17b, *B. longum* subsp. *infantis*;
17c, *B. longum* subsp. *suis*; 18, *B. magnum*; 19, *B. merycicum*;
20, *B. minimum*; 21, *B. mongoliense*; 22, *B. pseudocatenulatum*.

ство к человеческому плазминогену. Взаимодействие с системой плазминогена/плазмина хозяина представляет собой новый компонент в молекулярных перекрестных взаимодействиях между бифидобактериями и организмом человека. Плазминоген является проферментом плазмина, трипсиноподобной сериновой протеазой с широкой субстратной специфичностью. Он синтезируется в основном гепатоцитами, однако выявлены и другие источники плазминогена, в том числе плазминоген синтезируется в кишечнике. В активной форме плазмин уча-

ствует в фибринолизе и деградации экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны. С прикреплением плазминогена на поверхности бактериальной клетки и его последующим преобразованием в плазмин, микроорганизм приобретает поверхностно-связанный белок с протеолитической активностью. Это облегчает миграцию бактерий между физическими и молекулярными барьерами макроорганизма и позволяет удовлетворять питательные потребности микробов в ходе колонизационного процесса. Недавно продемонстрировано действие

енолазы как плазминоген-связывающего рецептора у трех видов бифидобактерий – *B. lactis*, *B. bifidum* и *B. longum*. При этом енолаза *B. lactis* отличается меньшим родством к плазминогену по сравнению с енолазой патогенных микроорганизмов – *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*. Дело в том, что у енолазы *B. lactis* присутствует только один сайт связывания с человеческим плазминогеном [9].

В адгезии бифидобактерий на эпителиальных клетках принимают участие также липотейхтовые кислоты (ЛТК). У всех грамположительных бактерий они состоят из 1,3-связанных цепей полиглицеролфосфата и гликолипидных фрагментов. Липотейхтовые кислоты закреплены в клеточной стенке посредством липидных остатков. У бифидобактерий ЛТК имеют уникальное строение, что обусловлено расположением анионных глицерофосфатных цепочек в виде боковых радикалов на галактофуранановых цепях. У *B. bifidum*, *B. breve*, и *B. longum* имеются два типа ЛТК, которые отличаются по содержанию жирных кислот [5]. Иногда дополнительные остатки жирных кислот могут быть присоединены к углеводному остатку липидного якоря, такому как галактопираноза. У бифидобактерий отмечается большое содержание в составе липидной части молекулы олеиновой и пальмитиновой кислот, доля которых достигает 40%, тогда как у стрептококка, например, их содержание не превышает 24%. У разных штаммов и видов бифидобактерий ЛТК отличаются по длине β-гликановых и β-галактофуранановых цепей, а также числом глицерофосфатных цепочек, т.е. как и у большинства микроорганизмов эти полимеры имеют таксономическое значение. С помощью ЛТК бифидобактерии обратимо связываются с колоноцитами, при этом взаимодействие с эпителиальными клетками происходит посредством липидной части кислот [5].

Таким образом, бифидобактерии обладают широким набором факторов адгезии, что позволяет им доминировать в кишечном микросимбиозе и успешно конкурировать в борьбе за сайты связывания на слизистой с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

Генетика бифидобактерий

Исследование генома бифидобактерий является важным шагом к пониманию механизмов взаимодействия между микробами и хозяином. Недавно были полностью секвенированы геномы *B. adolescentis*, *B. animalis subsp. lactis*,

B. longum subsp. longum, *B. longum subsp. infantis*. Эти геномы показывают высокое сходство последовательностей по всей хромосоме с некоторыми особенностями для каждого штамма [1].

В геноме *B. longum subsp. longum*, выделенной от младенца, было определено 1730 нуклеотидных последовательностей с соотношением G+C пар равным 60 моль%. Биоинформационный анализ выявил несколько особенностей, которые могут объяснить успешную адаптацию этого микроорганизма в толстой кишке. У *B. longum subsp. longum* неожиданно большое количество белков оказались специализированы для катаболизма различных олигосахаридов, некоторые, возможно, являются редкими или новыми гликозилгидролазами, действующими на неперевариваемые волокна или на производные гликопротеинов и гликоконъюгатов. Это умение утилизировать большое количество разнообразных питательных веществ, способствует повышению конкурентоспособности и устойчивости бифидобактерий в толстой кишке [1].

Также был секвенирован геном *B. longum subsp. infantis*. Этот крупнейший геном среди бифидобактерий, состоящий из 2832748 нуклеотидных пар. Это геном отражает конкурентную стратегию, ориентированную на использование молока, которое имеет огромную ценность для новорожденного. Несколько хромосомных локусов отражают адаптационный потенциал данных бифидобактерий, в том числе 43 kbp кластер, который осуществляет кодировку внеклеточных белков и пермеаз, активных в отношении олигосахаридов молока. Анализ олигосахаридов, присутствующих в грудном молоке, и возможностей метаболизма у «младенческих» штаммов является основой для гипотезы о трёх эволюционных механизмах: грудное молоко–младенец–бифидобактерии. Грудное молоко является источником олигосахаридов, которые не перевариваются в кишечнике ребенка, а используются бифидобактериями, которые играют важную роль для младенческого организма.

При исследовании генома 1461 изолятов бифидобактерий, относящихся к 24 видам, у 20% были обнаружены плазмиды [1]. Однако только четыре вида этих бактерий содержали внехромосомные факторы наследственности, а именно *Bifidobacterium longum subsp. longum*, *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*,

Bifidobacterium asteroides и *Bifidobacterium indicum*. *Bifidobacterium longum subsp. longum* имеют несколько плазмид (1,25–9,5 Мда), *B. pseudolongum subsp. globosum*, содержит одну плазмиду из трех классов молекулярных масс (13,5, 24,5 и 46 Мда). *B. indicum* содержат одну плазмиду массой 22 Мда. Примечательно, что *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, тесно связанная с *Bifidobacterium longum subsp. longum*, не содержала плазмид, хотя штаммы этих видов были изолированы от одних и тех же людей. Позже плазмиды были также выделены у *B. breve*. Все плазмиды до сих пор плохо изучены. Только у *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum* обнаруживается связь между плазмидными генами и ауксотрофностью по L-лейцину. У остальных бифидобактерий фенотипические свойства не коррелируют с наличием плазмид [1].

Питание и условия роста бифидобактерий

Важными компонентами для стимулирования роста бифидобактерий являются биотин, кальций пантотенат и пиридоксин. Также стимулирует рост бифидофлоры панкреатин. Для *B. asteroides* незаменимы парааминобензойная и фолиевая кислоты. Исследование потребностей в питании девяти видов *Bifidobacterium* человеческого и животного происхождения, в том числе *B. dentium*, показало большую гетерогенность среди видов по этому признаку, но чаще всего необходимыми питательными веществами для роста являются пантотенат кальция и рибофлавин. Большое количество бифидобактерий в качестве единственного источника азота могут использовать соли аммония. Однако *B. choerinum*, *B. cuniculi*, *B. magnum*, *B. pseudolongum subsp. globosum* и *B. longum subsp. suis* не растут в отсутствие органического азота. Активность ферментов, таких как глутаматдегидрогеназа и глутаминсинтетаза позволяет бифидобактериям ассимилировать аммиак. В средах с органическими соединениями азота значительное количество аминокислот продуцируют виды *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. dentium*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis* и *Bifidobacterium thermophilum*. В общем пуле продуцируемых бифидобактериями аминокислот большая доля приходится на сумму аланина, аспарагиновой кислоты и валина. *B. bifidum* способны продуцировать треонин [1].

Сравнительные исследования по синтезу водорастворимых витаминов (цианокобаламина, фолиевой и пантотеновой кислоты, никотино-

вой кислоты, пиридоксина, рибофлавина, тиамина) среди видов, выделенных из человеческих фекалий, показали, что многие штаммы могут синтезировать все перечисленные витамины, за исключением пантотеновой кислоты и рибофлавина [1]. Концентрация витаминов широко варьирует у различных видов или штаммов. Также была продемонстрирована способность бифидобактерий синтезировать биотин.

Некоторые факторы, получившие название «бифидогенных-факторов», способны стимулировать рост именно бифидобактерий. Первый «бифидогенный-фактор» был обнаружен в 1954 году, он был найден в грудном молоке. Этот фактор был позже найден в составе гликопротеинов и олигосахаридов, содержащих N-ацетил-d-глюкозамин. Другим стимулирующим бифидобактерии фактором, как предполагали, является низкое содержание белка в человеческом молоке [1, 11]. Сниженное содержание белка в молоке уменьшает буферную емкость и таким образом способствует формированию кислотной среды в кишечнике, что должно способствовать росту бифидобактерий. Однако в экспериментальных исследованиях [1, 11] использование сниженного содержания протеина в молочной смеси (1,2 г/100 мл) не увеличивало количество бифидобактерий.

Росту бифидобактерий способствует лактоферрин – железо-связывающий белок. Лактоферрин из зрелого коровьего молока увеличивает *in vitro* рост *B. breve* и *B. infantis* в зависимости от концентрации, в то время как лактоферрин человека способствует росту *B. bifidum*, но не *B. breve* и *B. infantis* [1].

Олиго- и полисахариды также классифицируются как «бифидогенные факторы». Было установлено, что олигомерные формы некоторых моносахаридов используются бифидофлорой более эффективно, чем мономерные [1, 11, 12]. Среди многочисленных олигосахаридов, олигосахариды сои, которые состоят в основном из трисахарида раффинозы и тетрасахарида стахиозы, стимулируют рост бифидобактерий. Недавно были выявлены и названы «бифидогенными факторами» фруктоолигосахариды (ФОС), синтетические олигосахариды, и трансгалактозилированные олигосахариды (ТОС). Гликоолигосахариды также способны стимулировать рост бифидобактерий, хотя и менее интенсивно, чем ФОС и ТОС [11, 12]. Полисахарид инулин увеличивает количество фекальных бифидобактерий, имея похожий

пребиотический эффект, что и олигофруктоза.

Отношение бифидобактерий к кислороду

Бифидобактерии – анаэробные микроорганизмы. Они, как правило, не развиваются в аэробных условиях. Однако чувствительность к кислороду варьирует в зависимости от штамма или вида. Большинство видов не развиваются в атмосфере CO₂-обогащенного воздуха (90% воздуха : 10% CO₂), но *Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum*, *Bifidobacterium thermophilum*, и *Bifidobacterium longum subsp. suis* способны продуцировать каталазу. *B. asteroides* растет в этих условиях и также является каталазоположительными. *B. indicum* ведет себя аналогично, но становятся каталазоположительными, только если к среде добавляется гемин. Большинство недавно описанных видов – *B. mongoliense*, *B. psychraerophilum*, и *B. tsurumiense* – способны расти в аэробных условиях [1].

Способность бифидобактерий переносить временные контакты с атмосферным кислородом связана с системами никотинамидадениндинуклеотид восстановленная форма – оксидаза (НАДН – оксидаза), никотинамидадениндинуклеотид восстановленная форма – пероксидаза (НАДН – пероксидаза). Показано, что *B. breve*, *B. infantis* и *B. longum* способны к слабому росту в условиях частичной аэрации. Эти виды бифидобактерий могут поглощать кислород, так как содержат НАДН – оксидазу, НАДН – пероксидазу. Надо отметить, что увеличению устойчивости бифидобактерий к кислороду способствует молочная кислота, вырабатываемая ими в процессе метаболизма углеводов [1].

Метаболизм и метаболические пути расщепления гексоз

Брожение из гексоз происходит у представителей рода *Bifidobacterium* через последовательность реакций (бифидо-шунт), которые показаны на **рисунке 2**. Многие ферменты для расщепления моно- и дисахаридов в фруктоза-6-фосфатном шунте не выявлены, но установлено присутствие арабинозидаз, А и В-галактозидаз, глюкозидаз, гексозаминидаз, инулиназы, изомальтазы, маннозидазы, неопулланазы и ксиланазы [1, 12-14].

В дополнение к этим ферментам, ответственным за расщепление сложных углеводов, были найдены восемь высокоаффинных олигосахарид-транспортёров и этим можно объяснить олигомирезацию сахаров [13, 14].

ФОС являются одними из сахаров, которые квалифицируются как пребиотики. Они включают в себя разнообразные семейства естественных олигосахаридов, используемых в продуктах питания и в виде пищевых добавок.

Они представляют собой неперевариваемые олигосахариды и состоят из коротких и средних цепей фруктозы, связанных β-(2-1) связью, которые в свою очередь соединены с глюкозой. Из-за этих β-(2-1) связей ФОС устойчивы к действию ферментов млекопитающих и, таким образом, способны достичь толстой кишки, где они служат источником легкоусвояемых субстратов для бифидобактерий. Инвертазы катализируют гидролиз β-(2-1) гликозидных связей сахарозы, которая распадается на смесь глюкозы и фруктозы в эквимольных соотношениях. Недавние исследования о деятельности инвертаз продемонстрировали способность бифидобактерий расщеплять ФОС, а также сахарозу. Экзоинулазы были обнаружены у *B. infantis* (ATCC 15697T). Этот фермент представляет собой мономерный белок (М-70 000 кДа), который катализирует деградацию инулина, 1-kestозы, нистозы, раффинозы и сахарозы [12, 13].

Установлено, что бифидобактерии обладают уреазой. Уреазная активность была найдена у всех видов бифидобактерий за исключением *B. cuniculi*. Наибольшую уреазную активность имеют *Bifidobacterium longum subsp. suis*, при чем более 80% бифидобактерий этого вида являются уреолитическими. Среди *B. breve* и *Bifidobacterium longum subsp. longum* только 10% штаммов являются уреолитическими, а *B. bifidum* характеризуются низкой уреазной активностью [1].

Экология бифидобактерий

Бифидобактерии являются резидентами пищеварительного тракта младенцев и взрослых [15]. Однако в исследованиях по изучению экологии бифидобактерий, проведенных кафедрой микробиологии Болонского университета (Италия), изолировано более 7000 штаммов из разных источников, а не только из кишечника [1].

Выделенные штаммы хранятся и поддерживаются в коллекции BUSCOB (Bologna University Scardovi Collection of Bifidobacteria) [1]. Исследования показали, что *B. bifidum* и *B. longum subsp. longum* чаще всего обнаруживают в кишечнике детей и взрослых, в то время как *B. dentium* вместе с другими представителями семейства *Bifidobacteriaceae*, такими как *Scardovia inopinata* и *Parascardovia denticolens*, являются

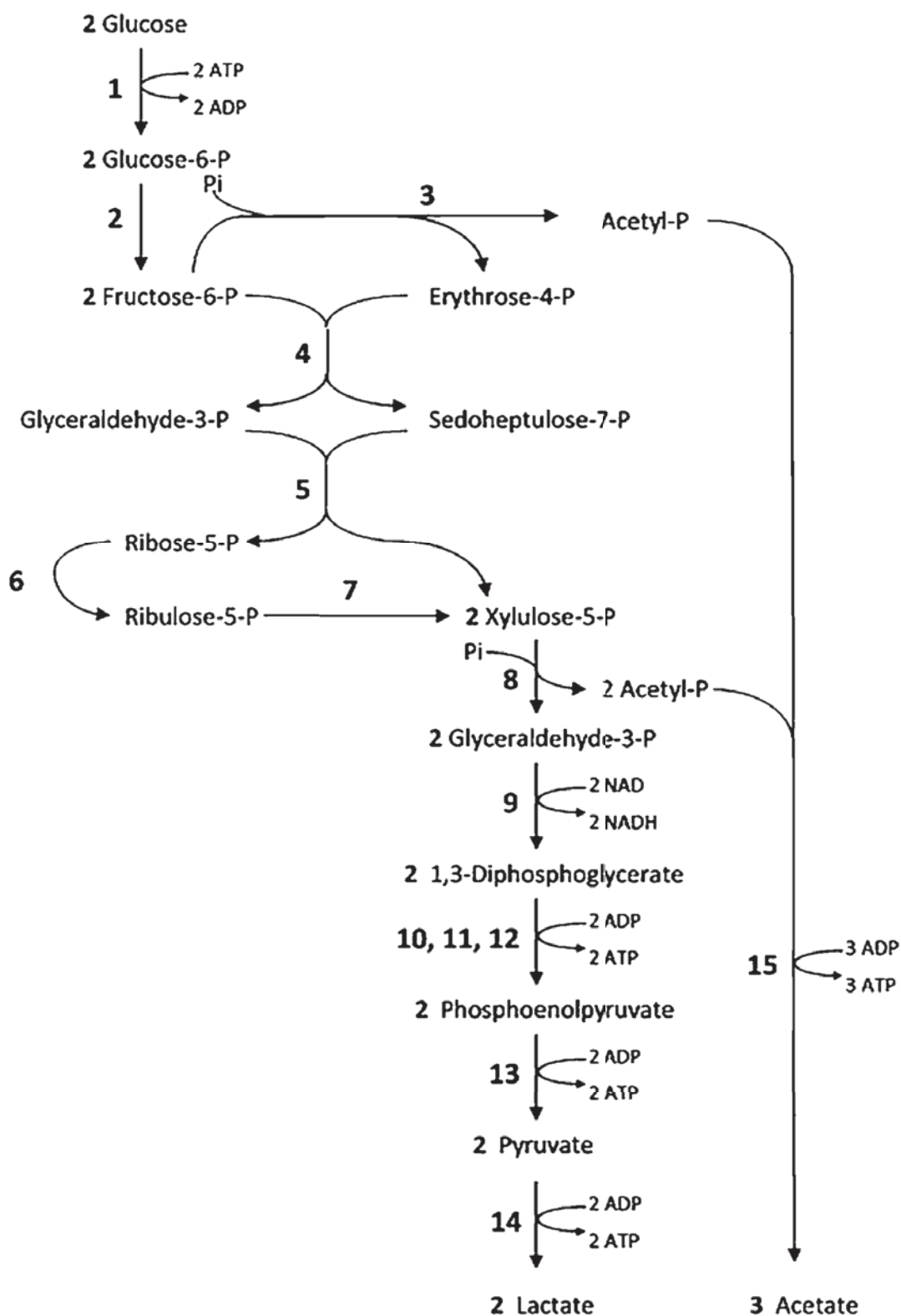


Рисунок 2.
Схема утилизации
глюкозы
бифидобактериями
(Bergey's Manual
of Systematic
Bacteriology, second
edition)

Figure 2.
Metabolism
of glucose by
bifidobacteria
(Bergey's Manual
of Systematic
Bacteriology, second
edition)

типичными представителями кариесных очагов [16]. *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *Bifidobacterium longum subsp. longum*, и *B. breve* обычно обнаруживают во влагалище здоровых женщин [17]. Кроме того, бифидобактерии получены от многих животных и от медоносных пчел [1].

Одиннадцать видов бифидобактерий были обнаружены в сточных водах: шесть человеческого происхождения и пять от животных [1]. *B. minimum* и *B. subtilis* были первоначально изолированы из сточных вод. Эти два вида не могли выделить из других биотопов в течение двух

десятилетий, таким образом, вставал вопрос о возможном развитии бифидобактерий в экстраэнтеральных экологических нишах. Однако в 2003 году *B. minimum* были изолированы из слепой кишки кролика, а в 2009 году *B. subtile* были изолированы от человека с кариозным поражением зубов. Это подтвердило, что канализация не является средой обитания для бифидобактерий. *B. mongoliense* выделили из кумыса. Недавно выделенные *B. thermacidophilum subsp. thermacidophilum* и *B. thermacidophilum* были изолированы из анаэробного варочного котла, который использовался для очистки сточных вод от отходов фермерского производства. Эти виды отличаются от других видов бифидобактерий по их способности расти при 49,5°C и в средах с pH 4.0. В 2002 году из человеческой крови были изолированы *B. scardovii*. Еще один недавно описанный вид *B. tsurumiense* изолирован из зубного налета хомячка, а в 2009 году из пищеварительного тракта шмелей выделены *B. bombi*. Таким образом, не смотря на анаэробный тип дыхания и сложные питательные потребности, бифидобактерии являются микроорганизмами с широким адаптивным потенциалом, которые можно выделить не только из различных биотопов человека и животных, но и из объектов окружающей среды.

Заключение

В связи с высокой генотипической гетерогенностью таксономия бифидобактерий ба-

зируется на сочетании молекулярно-генетических, фенотипических и филогенетических признаков. Использование комбинированного принципа (полифазная таксономия) позволило реклассифицировать множество видов бифидобактерий.

Бифидобактерии обладают очень большим набором фимбриальных и афимбриальных адгезинов, что позволяет им конкурировать в борьбе за сайты связывания на слизистой кишечника с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

Исследование генома бифидобактерий раскрывает высокий адаптационный потенциал данных микроорганизмов к симбиотическим взаимоотношениям с человеком. Адаптационная пластичность обусловлена гетерогенностью бифидобактерий по отношению к температуре и кислороду, которая варьирует в зависимости от штамма и вида. Кроме того, бифидобактерии обладают широким набором сахаролитических ферментов, позволяющим им сбраживать огромное количество гексоз через уникальный «бифидо-шунт». Благодаря экологической пластичности бифидобактерии можно обнаружить не только в различных биотопах человека, животных и насекомых, но их также можно выделить из окружающей среды, что изменяет мнение о том, что они являются прихотливыми анаэробными микроорганизмами, которые «зависят» от организма хозяина-симбионта.

Литература / References:

1. Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 5, parts A and B, Springer-Verlag, New York, 2012: 2031 p. 2
2. Levanova LA, Zakharova YuV. Systematics, taxonomy and classification of bacteria. Fundamental and Clinical Medicine. 2017; 1(2): 91-101. Russian (Леванова Л.А., Захарова Ю.В. Систематика, таксономия и классификация бактерий // Фундаментальная и клиническая медицина. 2017. № 1 (2). С. 91-101).
3. Salgina AV, Bondarenko TA, Ivanova EV, Perunova NB. Comparison of methods for identification of the genus Bifidobacterium. Vestnik of Orenburg State University. 2014; 13 (174): 92-95. Russian (Салгина А.В., Бондаренко Т.А., Иванова Е.В., Перунова Н.Б. Сравнение методов идентификации представителей рода Bifidobacterium // Вестник Оренбургского государственного университета. 2014. № 13 (174). С. 92-95).
4. Amerhanova AM. Morphological variability of microorganisms of bifidobacterium genus. Public Health and Environment. 2012; (12): 33-35. Russian (Амерханова А.М. Морфологическая изменчивость микроорганизмов рода бифидобактериум // Здоровье населения и среда обитания. 2012. №12. С. 33-35).
5. Percy MG, Grundling A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. Annu Rev Microbiol. 2014; 68: 81-100.
6. Zakharova YuV. Factors of adhesion of bifidobacteria. Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunology. 2016; (5): 80-87. Russian (Захарова Ю.В. Факторы адгезии бифидобактерий. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 80-87).
7. Zakharova Yu, Sukhikh AS. Chromatographic analyses of membrane fatty acid Bifidobacterium with different hydrophobicity. Sorption and Chromatographic Processes. 2015; 6 (15): 280-287. Russian (Захарова Ю.В., Сухих А.С. Хроматографический анализ жирных кислот клеточных стенок бифидобактерий с разной гидрофобностью // Сорбционные и хроматографические процессы. 2015. № 6 (15). С. 280-287).
8. Turrone F, Serafini F, Mangifesta M, Arioli S, Mora D, van Sinderen D, et al. Expression of sortase-dependent pili of

- Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in response to environmental gut conditions. FEMS Microbiol Lett. 2014; 357 (1): 23-33.
9. Wei X, Yan X, Chen X, Yang Z, Li H, Zou D, et al. Proteomic analysis of the interaction of *Bifidobacterium longum* NCC2705 with the intestine cells Caco-2 and identification of plasminogen receptors. J Proteomics. 2014;108: 89-98.
 10. Milani C, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario C, et al. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. Appl Environ Microbiol. 2015; 82(4): 980-991.
 11. Gibson GR, Rastall RA. Prebiotics: development and applications. John Wiley and Sons, Ltd, 2006: 256.
 12. Sannohe Y, Fukasawa T, Koda J, Kubota H, Kanegae M. Comparison of the growth of *Bifidobacteria* in two culture media containing either 1-kestose (GF₂) or nystose (GF₃). Bioscience Microflora. 2008; 27(1): 13-17.
 13. Turrone F, Strati F, Foroni E, Serafini F, Duranti S, van Sinderen D, et al. Analysis of predicted carbohydrate transport systems encoded by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(14): 5002-5012.
 14. González-Rodríguez I, Gaspar P, Sánchez B, Gueimonde M, Margolles A, Neves AR. Catabolism of glucose and lactose in *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, studied by ¹³C nuclear magnetic resonance. Appl Environ Microbiol. 2013; 79(24): 7628-7638.
 15. Sivieri K, Bassan J, Peixoto G, Monti R. Gut microbiota and antimicrobial peptides. Anaerobe. 2017; 44: 48-50.
 16. Beighton D, Al-Haboubi M, Mantzourani M, Gilbert SC, Clark D, Zoitopoulos L, et al. Oral Bifidobacteria: caries-associated bacteria in older adults. J Dent Res. 2010; 89(9): 970-974.
 17. Freitas AC, Hill JE. Quantification, isolation and characterization of *Bifidobacterium* from the vaginal microbiomes of reproductive aged women. Anaerobe. 2017; 47: 145-156.

Сведения об авторах

Захарова Юлия Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: написание лекции, поиск литературы.

Леванова Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: написание и оформление лекции.

Корреспонденцию адресовать:

Захарова Юлия Викторовна
650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22 а,
E-mail: yvz@bk.ru

Статья поступила: 30.12.17г.

Принята к печати: 01.03.18г.

Authors

Dr. Yuliya V. Zakharova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed a literature search; wrote the manuscript.

Prof. Lyudmila A. Levanova, MD, PhD, Head of the Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: wrote the manuscript.

Corresponding author:

Dr. Yuliya V. Zakharova,
22a Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation
E-mail: yvz@bk.ru

Acknowledgements: There was no funding for this project.