



Пробиотические свойства композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в условиях *in vitro*

Н.Б. Перунова^{1,2}✉, О.В. Бухарин¹, Е.В. Иванова¹, А.В. Бекпергенова¹,
Т.А. Бондаренко¹

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, ул. Пионерская, д. 11, г. Оренбург, 460000, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Одесская, д. 54, г. Тюмень, 625023, Российская Федерация

✉ Перунова Наталья Борисовна; nbperunova@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Активный поиск пробиотических штаммов микроорганизмов, в том числе относящихся к индигенным штаммам бифидобактерий, является важной задачей при создании лечебно-профилактических пробиотических препаратов. При определении пробиотического потенциала кандидатных штаммов необходима их оценка по показателям жизнеспособности бактерий, чувствительности к антибиотикам, устойчивости к желудочному соку и желчи, лизоцимрезистентности и биоупленкообразованию.

ЦЕЛЬ. Характеристика композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в качестве потенциального пробиотического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Использованы штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505. Оценивали чувствительность штаммов к антибиотикам, а также устойчивость к желудочному соку и желчи. Проводили исследование монокультур бифидобактерий *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции по количеству жизнеспособных клеток при культивировании, антилизотимной активности (лизотимрезистентности), биоупленкообразованию. При определении антагонистической активности в качестве тест-штаммов условно-патогенных и патогенных культур использовали *Candida albicans* ATCC 24433, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278_PBV. Содержание уксусной кислоты в среде культивирования определяли методом газожидкостной хроматографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Отобранные по критериям численности, лизоцимрезистентности и биоупленкообразования индигенные штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 не имели генов патогенности, обладали устойчивостью к ряду антимикробных препаратов (бензилпенициллин, стрептомицин и эритромицин) и сохраняли свою жизнеспособность в присутствии желчи в течение 2 ч и желудочного сока — 30 мин. Исследуемые культуры бифидобактерий обладали биосовместимостью: в композиции штаммов через 48 ч количество микробных клеток было выше, чем в монокультурах. При совместном культивировании штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 проявляли синергетический эффект, повышая уровень лизоцимрезистентности до $2,2 \pm 0,30$ мкг/мл $\times$ ОП₄₅₀, биоупленкообразования до $0,89 \pm 0,20$ ед. ОП₆₃₀ и продукцию ацетата до 33,2 мМ/л. Композиция бифидобактерий обладала более выраженной антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам бактерий и грибов (зоны угнетения роста тест-культур 30–36 мм) в сравнении с монокультурами (зоны угнетения роста тест-культур 18–24 мм).

ВЫВОДЫ. Индигенные штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 устойчивы к антимикробным препаратам, желчи и желудочному соку. При совместном культивировании штаммов выявлен синергетический эффект в отношении усиления показателей лизоцимрезистентности, биопленкообразования и антагонистической активности. Исследованные штаммы бифидобактерий и их композиция перспективны с целью создания новых пробиотических препаратов. Оценка лизоцимрезистентности и биопленкообразования может быть рекомендована в качестве показателей адаптивного потенциала микробиоты при отборе и тестировании пробиотических штаммов.

Ключевые слова: индигенные штаммы бифидобактерий; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium longum*; пробиотик; пробиотические свойства; лизоцимрезистентность; биопленкообразование; антибиотикорезистентность; устойчивость к желудочному соку; устойчивость к желчи; антагонистическая активность

Для цитирования: Перунова Н.Б., Бухарин О.В., Иванова Е.В., Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А. Пробиотические свойства композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в условиях *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):203–213. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565>

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР по теме государственного задания Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН «Исследование симбиотических систем про- и эукариот в биологии и медицине» № 122020100106-5.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Probiotic properties of an indigenous strain composition of *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 and *Bifidobacterium longum* ICIS-505 *in vitro*

Natalia B. Perunova^{1,2}✉, Oleg V. Bukharin¹, Elena V. Ivanova¹,
Anastasia V. Bekpergenova¹, Taisia A. Bondarenko¹

¹ Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 11 Pionerskaya St., Orenburg 460000, Russian Federation

² Tyumen State Medical University, 54 Odesskaya St., Tyumen, 625023 Russian Federation

✉ Natalia B. Perunova; nbperunova@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. An active search for probiotic strains of microorganisms, particularly indigenous bifidobacteria, is crucial for the development of therapeutic and prophylactic probiotics. Evaluating the probiotic potential of candidate strains requires their assessment for bacterial viability, antibiotic sensitivity, gastrointestinal stress tolerance, lysozyme resistance, and biofilm formation capacity.

AIM. This study aimed to characterise a composition of indigenous *Bifidobacterium* strains, *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505, as a potential probiotic product.

MATERIALS AND METHODS. The study tested *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 for resistance to antibiotics, gastric acid, and bile. Mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 were tested for the number of viable cells during culture, antilysozyme activity (lysozyme resistance), and biofilm formation capacity. Antagonistic activity was tested against test strains of bacteria and fungi, including *Candida albicans* ATCC 24433, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, and *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278_PBV. The content of acetic acid in the culture medium was determined by gas–liquid chromatography.

RESULTS. The indigenous strains, *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505, were selected according to the criteria of abundance, lysozyme resistance, and biofilm formation. These strains were found to lack pathogenicity genes, exhibit resistance to a number of antimicrobials (benzylpenicillin, streptomycin, and erythromycin), and remain viable in the presence of

bile for 2 hours and in the presence of gastric acid for 30 minutes. The study demonstrated the biocompatibility of *Bifidobacterium* cultures, with the composition of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 having a higher microbial cell count after 48 hours than monocultures. When co-cultured, *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 demonstrated a synergistic effect, resulting in increased lysozyme resistance (up to $2.2 \pm 0.30 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{450}$), biofilm formation (up to $0.89 \pm 0.20 \text{OD}_{630}$ units), and acetate production (up to 33.2 mM/L). The antagonistic activity against test strains was more pronounced in the co-culture than in the monocultures, with the respective growth inhibition zones of 30–36 mm and 18–24 mm.

CONCLUSIONS. Indigenous *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 have demonstrated resistance to antimicrobial agents, bile salts, and gastric acid. Co-culturing the strains has revealed a synergistic effect on their lysozyme resistance, biofilm formation capacity, and antagonistic activity. The strains of bifidobacteria and the composition thereof hold promise for the development of novel probiotics. The evaluation of lysozyme resistance and biofilm formation capacity, as indicators of the adaptive potential of the microbiota, may be recommended for the selection and testing of probiotic strains.

Keywords: indigenous *Bifidobacterium* strains; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium longum*; probiotics; probiotic properties; lysozyme resistance; biofilm formation; antimicrobial resistance; gastric acid resistance; bile resistance; antagonistic activity

For citation: Perunova N.B., Bukharin O.V., Ivanova E.V., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A. Probiotic properties of an indigenous strain composition of *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 and *Bifidobacterium longum* ICIS-505 *in vitro*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):203–213. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565>

Funding. This study was conducted by the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, as part of the research and development work under State Assignment No. 122020100106-5 Study of symbiotic systems of pro- and eukaryotes in biology and medicine.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения микробиоты — важный фактор в патогенезе инфекционных и соматических заболеваний. Индигенная (постоянно присутствующая) микробиота человека выступает одним из ключевых компонентов системы физиологической защиты организма человека [1, 2]. Бифидобактерии входят в состав индигенной микробиоты человека [3], являясь одними из немногих симбиотических микроорганизмов, не обладающих патогенными свойствами, отличающихся при этом рядом полезных характеристик [1, 2]. Наличие бифидобактерий в кишечнике человека оказывает влияние на развитие иммунной системы, поддержание кишечного гомеостаза и обеспечение защиты биотопа организма-хозяина от проникновения патогенов [4, 5]. Бифидобактерии активно продуцируют различные биологически активные соединения: витамины, полифенолы, конъюгированные линолевые кислоты, короткоцепочечные жирные кислоты и др. [6]. Многофункциональная роль бифидобактерий в организме человека определила перспективы их использования в качестве основы для пробиотических препаратов [1, 2, 7] и продуктов функционального питания [8].

Пробиотические свойства бифидобактерий штаммоспецифичны и связаны с определенным, уникальным набором биологических

характеристик конкретных штаммов [1, 9], которые оцениваются на этапе отбора культур микроорганизмов [10]. Так как на этапе отбора не всегда учитываются особенности адаптации и выживания микробных культур в организме хозяина и возможность их быстрой элиминации из биотопа кишечника, то это обуславливает в ряде случаев низкую клиническую эффективность применяемых пробиотиков [11]. Одним из способов повышения эффективности пробиотических препаратов является создание микробных консорциумов [12]. Известно, что штаммы бифидо- и лактобактерий могут вступать в конкурентные взаимоотношения как между собой, так и с представителями нормальной микробиоты [13], и лишь транзиторно сохраняются в организме.

В проведенных ранее исследованиях с использованием штаммов из коллекции бифидобактерий лаборатории инфекционной симбиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН) были выявлены критерии индигенности микроорганизмов с учетом особенностей их персистенции (адаптации) — длительного выживания микроорганизмов в организме хозяина [3, 14]. Было установлено два стабильных параметра персистенции индигенных микросимбионтов,

определяющих высокий уровень их присутствия в толстом кишечнике человека, — лизоцимрезистентность (ЛР) и биопленкообразование (БПО) [3, 15]. Известно, что процесс формирования биопленок бактериями является универсальным и рассматривается как форма существования микроорганизмов [16].

Указанные параметры могут быть пригодны при отборе индигенных штаммов бифидобактерий для их включения в состав пробиотических препаратов [17], а также при определении уровня биосовместимости штаммов в композиции [18] в контексте создания мультиштаммовых пробиотиков. Важным аспектом при создании пробиотических препаратов является изучение межмикробных взаимодействий используемых культур, которые могут проявлять в отношении друг друга антагонистическую активность или конкурировать за питательные вещества [19].

Цель работы — характеристика композиции индигенных штаммов *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 и *Bifidobacterium longum* ICIS-505 в качестве потенциального пробиотического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Штаммы бифидобактерий. В работе использовали штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505, ранее выделенные из испражнений здоровых лиц в лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН. Предварительно штаммы бифидобактерий были идентифицированы по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам [20, 21]. Видовую принадлежность штаммов определяли по масс-спектру белков методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS с помощью системы Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия), а также с использованием высокопроизводительного секвенирования 16S рПНК на платформе MiSeq (Illumina, США). Геномные последовательности штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 представлены в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank (NBVL000000000¹, RJZF000000000¹²). Штаммы депонированы в Государственной коллекции нормальной микрофлоры ФБУН «Московский научно-

исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (№ 1258 и 1260 соответственно) и в сетевой коллекции симбиотных микроорганизмов и их консорциумов (СКСМ) ИКВС УрО РАН (№ 00004В и 00005В соответственно).

Тест-штаммы. Для определения антагонистической активности индигенных штаммов использовали культуры из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) — *Candida albicans* ATCC 24433, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022; коллекции СКСМ ИКВС УрО РАН *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278_PBV (DDBJ/ENA/GenBank NCVU000000000.1³; СКСМ ИКВС УрО РАН № 00007В). Для определения лизоцимрезистентности использован штамм *Micrococcus luteus* ATCC 15307 (ATCC, США).

Питательные среды. Бифидум-среда (кат. № О53) и агар бактериологический (кат. № О58) производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (Россия), агар Шадлера (кат. № М291, HiMedia Laboratories, Индия), бульон Шадлера (кат. № М292, HiMedia Laboratories, Индия).

Методы

Аннотация и анализ генома. Аннотацию и первичный анализ генов проводили с использованием онлайн-инструментов RAST⁴. Итоговая аннотация геномов бифидобактерий была выполнена автоматически с помощью сервиса NCBI PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)⁵ после их депонирования в базе данных NCBI GenBank (NIH, США).

Определение чувствительности к антибиотикам. Чувствительность к антибиотикам *in vitro* определяли диско-диффузионным методом с использованием Бифидум-среды и дисков для оценки антибиотикочувствительности (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Россия)⁶. Для получения плотной питательной среды в Бифидум-среду дополнительно вносили агар бактериологический (15 г/л). Исследовали чувствительность к антимикробным препаратам, относящимся к группам пенициллинов, аминогликозидов, тетрациклинов,

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NBVL000000000>

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/RJZF000000000>

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NCVU000000000>

⁴ <https://rast.nmpdr.org/>

⁵ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/annotation_prok/

⁶ МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов» (утв. Роспотребнадзором 06.12.2010).

фторхинолонов, макролидов, сульфаниламидов, гликопептидов и фузидина.

Оценка выживаемости бифидобактерий в биологических средах. Для оценки выживаемости использовали имитацию желудочного сока (NaCl — 2,2 г; HCl — 9,9 мл 0,11 М; пепсин свиной — 3,5 ЕД/мл; вода дистиллированная до 1 л, pH 2,8±0,1) и желчь (медицинская консервированная, HiMedia Laboratories, Индия). Монокультуры и композицию штаммов бифидобактерий (10⁸ КОЕ/мл) инкубировали при 37±1 °С в присутствии желудочного сока в течение 30 мин, в присутствии желчи — в течение 2 ч. Контрольные образцы монокультуры и композиции штаммов (10⁸ КОЕ/мл) инкубировали в 0,9% растворе NaCl в течение 30 мин и 2 ч соответственно. Опытные и контрольные образцы монокультуры и композиции штаммов высевали на агар Шадлера и инкубировали в анаэробных условиях при 37±1 °С в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) в течение 48±1 ч.

Определение жизнеспособных бактерий (чашечный метод)⁷. Для определения жизнеспособных клеток монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 готовили микробную взвесь, соответствующую 0,5 ед. по стандарту МакФарланда (McFarland standard 1×10⁸ КОЕ/мл; кат. № R092; HiMedia Laboratories, Индия). Каждый штамм (1 мл) засеивали в 9 мл бульона Шадлера. Приготовленные по стандарту МакФарланда суспензии двух штаммов, *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 (1 мл), смешивали в соотношении 1:1 и засеивали в 9 мл бульона Шадлера. Монокультуры и смешанную культуру помещали в CO₂-инкубатор при 37±1 °С в течение 0, 24, 48 и 72 ч. После инкубирования культуры перемешивали на шейкере (Heidolph Reax, Германия), проводили серийные разведения, высевали на агар Шадлера и помещали в CO₂-инкубатор при 37±1 °С в течение 48±1 ч. Далее учитывали количество выросших колоний бифидобактерий и определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. В смешанной культуре штаммы различали по морфотипам, описывая форму колоний. Колонии *B. bifidum* ICIS-310: мелкие (диаметр колонии 1–2 мм), плоские, кремового цвета, округлые. Колонии *B. longum* ICIS-505: более крупные по размеру (диаметр колонии 3–4 мм) и более выпуклые в сравнении с *B. bifidum* ICIS-310, сметанообразные, белые, округлые.

Определение антагонистической активности индигенных штаммов. Антагонистическую активность бифидобактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов оценивали методом отсроченного антагонизма на плотной среде⁸. По 5 мкл суспензии каждого штамма и композиции бифидобактерий (10⁸ КОЕ/мл) пипеткой вносили в центр чашки с агаром Шадлера. После инкубации при 37±1 °С в CO₂-инкубаторе в течение 48±1 ч культуры были обработаны парами хлороформа (100 мкл, 30 мин). Далее на чашку Петри наносили полужидкий агар Шадлера (4,9 мл, 0,7%), предварительно инокулированный тест-штаммами (0,1 мл, 10⁸ КОЕ/мл). После инкубации в течение 18±1 ч при температуре 37±1 °С измеряли диаметр зон задержки роста тест-штаммов (мм). Штаммы бифидобактерий обладали антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам при наличии зоны угнетения роста более 10 мм.

Оценка биопленкообразования. Образование биопленок изучали по адгезии микроорганизмов к поверхности 96-луночного полистиролового стерильного планшета [22]. Бифидобактерии культивировали на агаре Шадлера при 37±1 °С в течение 48±1 ч. Затем готовили бактериальную суспензию (10⁸ КОЕ/мл) и добавляли 15 мкл к 135 мкл бульона Шадлера в 96-луночный планшет. В качестве контроля использовали 150 мкл стерильного бульона Шадлера. После инкубации планктонные клетки удаляли встряхиванием, а образование биопленок анализировали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым (0,1%). Количественную оценку биомассы биопленки проводили путем измерения оптической плотности при 630 нм (ОП₆₃₀) с помощью фотометра ELx 808 (BioTek, США).

Лизоцимрезистентность (антилизозимная активность). Для определения ЛР бактерий использовали фотометрический метод, описанный в работе О.В. Бухарина [14]. Культуры бифидобактерий выращивали в бульоне Шадлера при 37±1 °С в CO₂-инкубаторе в течение 48±1 ч. Затем измеряли ОП бульонной культуры (ОП₄₅₀) против чистого бульона Шадлера. Полученные бульонные культуры центрифугировали в течение 15 мин при 3200 g, стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм, MF-Millipore, Германия) и получали бесклеточные супернатанты бифидобактерий. В качестве тест-штамма

⁷ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁸ ОФС.1.7.2.0012.15 Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

для определения ЛР использовали ацетонированную агаровую культуру *M. luteus* ATCC 15307. Культуру растворяли в 0,9% растворе NaCl, доводили оптическую плотность до 0,30 (0,28–0,32). Готовили раствор лизоцима (Sigma Aldrich, США) с концентрацией 20 мкг/мл в 1/15 М фосфатном буфере (pH 6,2). Опытные пробы готовили из бесклеточного супернатанта бифидобактерий, смешивая с 0,9 и 0,1 мл раствора лизоцима, в контрольных пробах вместо бесклеточного супернатанта использовали питательный бульон. Пробы инкубировали 120 мин при 37±1 °С. Далее проводили определение уровня ЛР культур по степени лизиса суспензии тест-штамма согласно формуле (1):

$$A = \frac{V_1 \times C \times (1 - \Delta D_0 / \Delta D_k)}{V_2 \times Y}, \quad (1)$$

где A — лизоцимрезистентность, выраженная в микрограммах инактивированного лизоцима в 1 мл супернатанта, мкг/мл×ОП₄₅₀; V_1 — объем раствора лизоцима исходной концентрации 20 мкг/мл (0,1 мл); V_2 — объем бесклеточного супернатанта бульонной культуры исследуемого штамма (0,9 мл); C — исходная концентрация лизоцима (20 мкг/мл); Y — ОП бульонной культуры исследуемого штамма, ед. ОП; ΔD_0 — изменение ОП суспензии тест-штамма в опытном образце в временном интервале между 30 и 150 с; ΔD_k — изменение ОП суспензии тест-штамма в контрольном образце между 30 и 150 с.

Содержание уксусной кислоты. Пробы для определения количества уксусной кислоты, продуцируемой штаммами бифидобактерий в монокультуре и композиции, получали при добавлении 1 мл бактериальной суспензии (10⁸ КОЕ/мл) в 9 мл бульона Шадлера (общий объем 10 мл) и помещали в CO₂-инкубатор при температуре 37±1 °С в течение 24–72 ч. Проводили измерение содержания уксусной кислоты в начальной временной точке внесения культур (0 ч), через 24, 48 и 72 ч.

Содержание уксусной кислоты при культивировании штаммов бифидобактерий определяли методом газожидкостной хроматографии⁹ с использованием хроматографа GC-2010 Plus (Shimadzu, Япония); детекцию проводили на пламенно-ионизационном детекторе с капиллярной колонкой HP-FFAP (Agilent Technologies, США), 0,32 мм, 50 м. Условия хроматографирования — температурный режим:

испаритель — 240 °С; детектор — 260 °С; программа для капиллярной колонки: 0 мин — 70 °С; 10 мин — 160 °С; 5 мин — 180 °С; 25 мин — 240 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость потока 21 см/сек, давление в колонке 74 кПа. Для определения количества компонента в пробе применяли метод абсолютной градуировки с предварительным построением калибровочного графика уксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию рассчитывали по площадям пиков с помощью программы GCsolution (Shimadzu, Япония).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США) и Microsoft Office Excel 2010. Результаты представляли в виде среднего и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный отбор штаммов бифидобактерий и анализ их генома

Предварительно проводили отбор индигенных штаммов бифидобактерий кишечника человека из коллекции лаборатории инфекционной симбиологии (ИКВС УрО РАН, Оренбург). Были отобраны культуры *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505, обладающие выраженными адаптивными свойствами индигенных штаммов по способности выживать в кишечнике человека [3, 17], имеющие высокие показатели микробной обсемененности в кишечнике (9,1 и 10,0 lg КОЕ/г соответственно), лизоцимрезистентности (1,62±0,2 и 1,8±0,2 мкг/мл×ОП₄₅₀ соответственно) и биопленкообразования (0,40±0,03 и 0,50±0,05 ед. ОП₆₃₀ соответственно).

Анализ генома штаммов бифидобактерий показал, что суммарная длина геномной последовательности *B. bifidum* ICIS-310 составила 2,21 млн п.н., *B. longum* ICIS-505 — 2,44 млн п.н. По объему генома штаммы можно оценить как находящиеся на уровне верхней границы размеров геномов известных представителей рода *Bifidobacterium* spp. (1,8–2,3 млн п.н.). Число белок-кодирующих генов у *B. bifidum* ICIS-310 составило 1718, у *B. longum* ICIS-505 — 2003.

При аннотации генома *B. bifidum* ICIS-310 выявлено, что самые большие группы генов относились к следующим подсистемным категориям: метаболизм белков (207 генов), аминокислоты и их производные (198 генов) и углеводы (143 гена). Другие значительные категории генома включали: кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты (73 гена), компоненты

⁹ МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов» (утв. Роспотребнадзором 06.12.2010).

клеточной стенки (70 генов), системы метаболизма ДНК (65 генов) и РНК (62 гена), метаболизма фосфора (35 генов), жирных кислот, липидов и изопреноидов (28 генов), гены деления клеток и клеточного цикла (26 генов).

В аннотированном геноме штамма *B. longum* ICIS-505 самые большие группы генов относились к категориям: аминокислоты и их производные (207 генов), системы метаболизма белков (204 гена) и углеводов (189 генов), кофакторы, витамины, пигменты (96 генов), система метаболизма РНК (70 генов), компоненты клеточной стенки (63 гена).

В геноме обоих штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 выявлен ген *vanZ*, кодирующий белок устойчивости к тейкопланину (гликопептидный антибиотик).

Проведенный анализ генома изучаемых штаммов бифидобактерий показал, что они не имеют генов патогенности и могут быть перспективны для дальнейшего исследования с целью создания пробиотических препаратов.

Исследование пробиотических свойств штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505

Исследование устойчивости штаммов к действию антибиотиков. При определении устойчивости к действию антибиотиков выявлено, что оба штамма бифидобактерий обладают антибиотикорезистентностью к пенициллинам, гентамицину и эритромицину (табл. S1, опубликована на сайте журнала¹⁰). Культура *B. bifidum* ICIS-310 была также устойчива к сульфаниламидам, ванкомицину и фузидину, а штамм *B. longum* ICIS-505 — к фторхинолонам.

Определение уровня экспрессии генов устойчивости к антибиотикам и возможности их передачи от пробиотических штаммов комменсальной микробиоте *in vivo* — важные аспекты при оценке безопасности бактерий для выбора штаммов. Это исключает риск передачи генов резистентности кишечной микробиоте [23]. Долгое время устойчивость молочнокислых бактерий к антимикробным препаратам оценивалась как допустимое свойство [24], и такие штаммы бактерий считались пригодными для использования в производстве пробиотиков и кисломолочных продуктов [25]. Однако недавние исследования показали, что молочнокислые бактерии, являющиеся носителями генов устойчивости к антибиотикам, могут передавать эти гены другим микроорганизмам [26]. Следует отметить, что благодаря генетической удаленности класса актинобактерий, включая бифидобактерии,

от большинства патогенных и условно-патогенных бактерий толстого кишечника, передача детерминант устойчивости к антибиотикам путем горизонтального переноса генов в их случае ограничена [27]. Кроме того, совместное применение пробиотиков и противомикробных препаратов может способствовать эффективно-му восстановлению микробиоценоза толстого кишечника человека на этапе лечения.

В дальнейшем для исключения риска горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности между изучаемыми штаммами и патогенной микрофлорой планируется провести анализ на наличие мобильных генетических элементов и плазмид, связанных с устойчивостью к антибиотикам, а также предполагается проведение исследований *in vivo*.

Оценка выживаемости *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в желудочном соке и желчи.

При отборе перспективных штаммов необходимым параметром оценки является изучение устойчивости бифидобактерий к биологическим секретам человека. Поскольку при прохождении пробиотических бактерий через желудочно-кишечный тракт они подвергаются воздействию желудочного сока и желчи [28], была проведена оценка влияния этих факторов на выживаемость культур бифидобактерий.

Изучение выживаемости штаммов бифидобактерий в желудочном соке и желчи в условиях *in vitro* показало, что количество жизнеспособных клеток в контрольных образцах как в монокультуре, так и в композиции без добавления желудочного сока и желчи составляло не менее 10^8 КОЕ/мл. После инкубации в желудочном соке в течение 30 мин отмечено уменьшение количества клеток обоих штаммов на 3 порядка — до 1×10^5 КОЕ/мл. Полученные данные свидетельствуют об устойчивости штаммов к данному стрессовому фактору. Следует отметить, что в модельных исследованиях при изучении воздействия желудочного сока в отношении современных пробиотических штаммов показано снижение выживаемости клеток на 5–6 порядков [29].

В условиях инкубирования культур бифидобактерий с желчью в течение 2 ч было выявлено уменьшение количества клеток *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 на 3–4 порядка — до $1,1 \times 10^4$ и 1×10^5 КОЕ/мл соответственно.

Определение количества жизнеспособных бактерий *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в монокультуре и композиции. Анализ количества жизнеспособных клеток *B. bifidum*

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565-table-s1>

Таблица 1. Динамика изменения количества жизнеспособных клеток в монокультуре бифидобактерий *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции

Table 1. Changes in the number of viable cells in mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 with time

Время культивирования, ч <i>Culture time, h</i>	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл <i>Number of viable cells, CFU/mL</i>				
	Монокультура <i>Monoculture</i>		Композиция <i>Co-culture</i>		
	<i>B. bifidum</i> ICIS-310	<i>B. longum</i> ICIS-505	<i>B. bifidum</i> ICIS-310	<i>B. longum</i> ICIS-505	ICIS-310 + ICIS-505
0	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	3×10^7	7×10^7	$1,0 \times 10^8$
24	$2,7 \times 10^9$	$3,1 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
48	$9,9 \times 10^9$	$10,3 \times 10^9$	$5,1 \times 10^9$	$5,6 \times 10^9$	$10,7 \times 10^9$
72	$8,4 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Показатели биопленкообразования и лизоцимрезистентности монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции

Table 2. Biofilm formation and lysozyme resistance of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 in mono- and co-cultures

Показатель <i>Parameter</i>	Монокультура <i>Monoculture</i>		Композиция штаммов <i>Co-culture</i>
	<i>B. bifidum</i> ICIS-310	<i>B. longum</i> ICIS-505	
БПО, ед. ОП ₆₃₀ <i>BFF, OD₆₃₀ units</i>	$0,40 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,20^*$
ЛР, мкг/мл × ОП ₄₅₀ <i>LR, $\mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{450}$</i>	$1,62 \pm 0,20$	$1,80 \pm 0,20$	$2,20 \pm 0,30^*$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. БПО — биопленкообразование; ЛР — лизоцимрезистентность; * — достоверные отличия значений относительно монокультур ($p < 0,05$).

Note. BFF, biofilm formation; LR, lysozyme resistance; *, significant differences from monocultures ($p < 0.05$).

ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в монокультуре и композиции (табл. 1) показал, что при раздельном культивировании количество жизнеспособных бифидобактерий увеличивалось к 48 ч ($p \leq 0,05$). В композиции культур штаммов через 48 ч количество микробных клеток было выше, чем в монокультурах ($p \leq 0,05$). Через 72 ч культивирования количество живых клеток снижалось как в монокультуре, так и в композиции. При расщепе композиции бифидобактерий выявлялись оба штамма. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые штаммы не подавляют рост друг друга при совместном культивировании.

При совместном культивировании *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 проявляли синергетический эффект, усиливая некоторые характеристики друг друга (табл. 2). Для оценки были выбраны показатели БПО и ЛР, которые хотя и не являются обязательными критериями анализа пробиотических культур, но авторы полагают, что их определение имеет важное значение для выявления адаптивного потенциала пробиотиков в организме человека. Было показано, что значения показателей БПО и ЛР в компози-

ции штаммов повышались до $0,89 \pm 0,20$ ед. ОП₆₃₀ и $2,2 \pm 0,30$ мкг/мл × ОП₄₅₀ ($p < 0,05$). Представленные данные свидетельствуют о биосовместимости штаммов изучаемых пробиотических культур [18].

Определение антагонистической активности *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 в монокультуре и композиции. При оценке пробиотического потенциала бифидокультур важным параметром является антагонистическая активность, отражающая способность к колонизации биотопа кишечника [30]. Для определения показателя проводили сравнительный анализ антимикробного действия штаммов бифидобактерий в монокультуре и композиции против тест-штаммов условно-патогенных и патогенных культур (табл. 3). Установлено, что оба штамма бифидобактерий обладали антагонистической активностью в отношении кишечной палочки, клебсиеллы и стафилококка, а культура *B. longum* ICIS-505 дополнительно подавляла рост тест-штаммов дрожжевых грибов, протей и шигеллы. При этом композиция штаммов обладала более выраженной антагонистической активностью (зоны угнетения роста тест-культур 30–36 мм).

Таблица 3. Антагонистическая активность монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции
Table 3. Antagonistic activity of mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505

Штаммы <i>Strains</i>	Зоны задержки роста тест-штаммов, мм <i>Zones of test strain growth inhibition, mm</i>					
	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	<i>K. pneumoniae</i> ICIS-278_PBV
<i>B. bifidum</i> ICIS-310	18,0±1,0	18,0±1,0	20,0±1,0	20,0±2,0	19,0±2,0	20,0±1,0
<i>B. longum</i> ICIS-505	21,0±2,0	22,0±3,0	21,0±2,0	22,0±2,0	20,0±2,0	24,0±1,0
<i>B. bifidum</i> ICIS-310 + <i>B. longum</i> ICIS-505	36,0±2,0*	30,0±2,0*	30,0±1,0*	30,0±2,0*	32,0±3,0*	34,0±3,0*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * достоверные отличия значений относительно монокультур ($p < 0,05$).

Note. * significant differences from monocultures ($p < 0.05$).

Оценка уровня продукции уксусной кислоты штаммами бифидобактерий. Возможным объяснением эффекта потенцирования антагонистической активности бифидобактерий в композиции может являться синергетическое действие штаммов на метаболическую активность друг друга. Проведена оценка уровня продукции бифидокультурами ацетата по определению содержания уксусной кислоты в бульоне Шадлера при культивировании монокультур бифидобактерий и их композиции (рис. 1). Показано, что повышение содержания уксусной кислоты в среде (в период от 0 до 72 ч) при культивировании композиции *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 происходило более интенсивно, чем в случае монокультур ($p \leq 0,05$), достигая уровня 33,2 мМ/л.

Выявленное усиление продукции ацетата в композиции бифидокультур имеет важное значение при создании препаратов пробиотиков. Известно, что уксусная кислота обладает антимикробным действием в отношении широкого спектра микроорганизмов, а кроме того, оказывает влияние на продукцию муцина, что, в свою очередь, может способствовать лучшему прикреплению пробиотических бактерий к клеткам эпителия кишечника и образованию биопленок [31].

ВЫВОДЫ

1. Проведен предварительный отбор штаммов *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 с учетом критериев микробной обсемененности в кишечнике человека, лизоцимрезистентности и биопленкообразования. Анализ генома штаммов показал, что они не имеют генов патогенности.
2. Определение устойчивости исследуемых культур к действию антибиотиков выявило, что оба штамма бифидобактерий обладают антибиотикорезистентностью к пенициллинам, гентамицину и эритромицину. Показана устойчивость штаммов к воздействию желудочного сока и желчи.

3. Анализ жизнеспособности *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 показал, что исследуемые штаммы не подавляют рост друг друга при совместном культивировании.
4. При совместном культивировании *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 выявлен синергетический эффект в отношении усиления показателей лизоцимрезистентности и биопленкообразования, что свидетельствует об адаптивном потенциале штаммов в организме человека.
5. Оценка лизоцимрезистентности и биопленкообразования может быть рекомендована в качестве показателей адаптации и персистенции микробиоты в условиях биотопа при отборе и тестировании пробиотических штаммов.

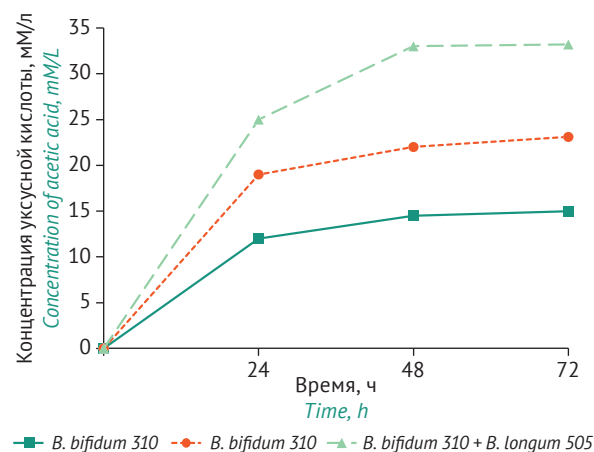


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика изменения содержания уксусной кислоты в среде при культивировании монокультур *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиции. На графике представлены средние значения (M) показателя.

Fig. 1. Changes in the acetic acid concentration in mono- and co-cultures of *B. bifidum* ICIS-310 and *B. longum* ICIS-505 with time. The plot shows mean concentrations (M).

6. Установлено, что оба исследуемых штамма бифидобактерий проявляли антагонистическую активность в отношении тест-штаммов условно-патогенных и патогенных культур. При этом композиция обладала более выраженной антагонистической активностью, а также более высокой способностью к продукции уксусной кислоты, что свидетельствует об их синергетическом действии.
7. Штаммы *B. bifidum* ICIS-310 и *B. longum* ICIS-505 и их композиция перспективны с целью создания новых пробиотических препаратов.
8. Актуальным направлением дальнейших исследований является проведение сравнительного анализа эффективности разработанной композиции штаммов бифидобактерий с коммерчески доступными пробиотическими препаратами.

Литература/References

1. Бухарин ОВ, Перунова НБ, Иванова ЕВ. *Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека*. Екатеринбург: УрО РАН; 2014. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV. *Bifidoflora in human associative symbiosis*. Ekaterinburg: UrO RAN; 2014 (In Russ.).
2. Шендеров БА. *Медицинская микробная экология и функциональное питание*. М.: ГРАИТ; 1998. Shenderov BA. *Medical microbial ecology and functional nutrition*. Moscow: GRANT; 1998 (In Russ.).
3. Бухарин ОВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ. Коренные штаммы бифидобактерий кишечника человека: индигенность через призму персистенции. *Вестник Российской Академии Наук*. 2023;93(11):1071–80. Bukharin OV, Ivanova EV, Perunova NB. Native strains of human intestinal bifidobacteria: Indigeneity through the prism of persistence. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 2023;93(11):1071–80 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0869587323110026>
4. Alessandri G, Ossiprandi MC, MacSharry J, van Sinderen D, Ventura M. Bifidobacterial dialogue with its human host and consequent modulation of the immune system. *Front Immunol*. 2019;10:2348. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02348>
5. Aw W, Fukuda S. Protective effects of bifidobacteria against enteropathogens. *Microb Biotechnol*. 2019;12(6):1097–100. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13460>
6. Bottacini F, van Sinderen D, Ventura M. Omics of bifidobacteria: Research and insights into their health-promoting activities. *Biochem J*. 2017;474(24):4137–52. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160756>
7. Bozkurt HS, Quigley EM. The probiotic *Bifidobacterium* in the management of Coronavirus: A theoretical basis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2020;34:2058738420961304. <https://doi.org/10.1177/2058738420961304>
8. He BL, Xiong Y, Hu TG, Zong MH, Wu H. *Bifidobacterium* spp. as functional foods: A review of current status, challenges, and strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;63(26):8048–65. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054934>
9. McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC. Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: A systematic review and meta-analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:124. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00124>
10. Żólkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics – a step beyond pre- and probiotics. *Nutrients*. 2020;12(8):2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>
11. Merenstein D, Pot B, Leyer G, Ouwehand AC, Preidis GA, Elkins CA, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut Microbes*. 2023;15(1):2185034. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034>
12. Амерханова АМ, Алешкин АВ, Жиленкова ОГ. Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, используемый для приготовления бактериальных препаратов и биологически активных добавок, предназначенных для коррекции микрофлоры людей старше 14 лет, способ его получения, биологически активная добавка к пище для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта людей старше 14 лет и бактериальный препарат для лечения дисбиотических состояний желудочно-кишечного тракта людей старше 14 лет. Патент Российской Федерации № 2491336; 2013. Amerkhanova AM, Aleshkin AV, Zhilenkova OG. Bifidobacterial and lactobacillary consortium for preparing bacterial preparations and dietary supplements for correcting gastrointestinal microflora in individuals of fourteen and older, and method for preparing it, dietary supplement for correcting gastrointestinal microflora in individuals of fourteen and older and bacterial preparation for treating dysbiotic gastrointestinal conditions in individuals of fourteen and older. Patent of the Russian Federation No. 2491336; 2013 (In Russ.). EDN: [GRJUWE](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
13. Глушанова НА, Вербицкая НБ, Петров ЛИ, Блинов АИ, Шендеров БА. Исследование ауто-, изо- и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл. *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2005;(6):138–42. Glushanova NA, Verbitskaya NB, Petrov LI, Blinov AI, Shenderov BA. Study of auto-, iso- and gomoantagonism of probiotical lactobacilli strains. *Bulletin of the VSNC SO RAMN*. 2005;(6):138–42 (In Russ.). EDN: [LGKXGN](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007081)
14. Бухарин ОВ. *Персистенция патогенных бактерий*. М.: Медицина; 1999. Bukharin OV. *Persistence of pathogenic bacteria*. Moscow: Meditsina; 1999 (In Russ.).
15. Zielke RA, LeVan A, Baarda BI, Herrera MF, Acosta CJ, Jerse AE, Sikora AE. SluC is a surface-displayed lipoprotein that is required for the anti-lysozyme strategy during *Neisseria gonorrhoeae* infection. *PLoS Pathog*. 2018;5;14(7):e1007081. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007081>
16. Ножевникова АН, Бочкова ЕА, Плакунов ВК. Мультивидовые биоупленки в экологии, медицине и биотехнологии. *Микробиология*. 2017;84(6):623–44. Nozhevnikova AN, Bochkova EA, Plakunov VK. Multispecies biofilms in ecology, medicine and biotechnology. *Microbiology*. 2017;84(6):623–44 (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S00026365615060117>
17. Бухарин ОВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ. Способ отбора индигенных штаммов бифидобактерий кишечника человека для их включения в состав пробиотических препаратов. Патент Российской Федерации № 2806579; 2023. Bukharin OV, Ivanova EV, Perunova NB. Method of selection of indigenic strains of human intestinal bifidobacteria for their inclusion in probiotic preparations. Patent of the Russian Federation No. 2806579; 2023 (In Russ.). EDN: [DSDIIC](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
18. Бухарин ОВ, Перунова НБ, Иванова ЕВ. Способ определения уровня биосовместимости штаммов бифидобактерий и/или лактобактерий. Патент Российской Федерации № 2676910; 2019. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV. Method for determining level of biocompatibility of bifid bacteria and/or lactic bacteria strains. Patent of the Russian Federation No. 2676910; 2019 (In Russ.). EDN: [SCYHTI](https://doi.org/10.3390/biology10040322)
19. Kwoji ID, Aiyegoro OA, Okpeku M, Adeleke MA. Multi-strain probiotics: Synergy among isolates enhances biological activities. *Biology (Basel)*. 2021;10(4):322. <https://doi.org/10.3390/biology10040322>
20. Бухарин ОВ, Перунова НБ, Иванова ЕВ, Бекпергенова АВ. Штамм бактерий *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 – продуцент ингибитора провоспалительного цитокина ИФН-γ. Патент Российской Федерации № 2670054; 2018. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV, Bekpergenova AV. *Bifidobacterium bifidum* ICIS-310 bacterium strain – producer of inhibitor of pro-inflammatory cytokine INF-γ. Patent of the Russian Federation No. 2670054; 2018 (In Russ.). EDN: [WAICBT](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
21. Бухарин ОВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ, Андрющенко СВ. Штамм бактерий *Bifidobacterium longum* ICIS-505 – продуцент биологически активных веществ, обладающих антиперсистиентной активностью в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий и дрожжевых грибов. Патент Российской Федерации № 2704423; 2018. Bukharin OV, Perunova NB, Ivanova EV, Andryushchenko SV. Bacterial strain *Bifidobacterium longum* ICIS-505 – producer of biologically active substances possessing antipersistent activity with respect to opportunistic and pathogenic bacteria and yeast fungi. Patent of the Russian Federation No. 2704423; 2018 (In Russ.). EDN: [IYKBDB](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00)
22. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol*. 2005; Chapter 1:Unit-1B.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>

23. Mater DD, Langella P, Corthier G, Flores MJ. A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;14(1–3):123–7. <https://doi.org/10.1159/000106091>
24. Pino A, Bartolo E, Caggia C, Cianci A, Randazzo CL. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. *Sci Rep*. 2019; 9(1):3355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40304-3>
25. Toomey N, Bolton D, Fanning S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Res Microbiol*. 2010;161(2):127–35. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.010>
26. Li B, Chen D, Lin F, Wu C, Cao L, Chen H, et al. Genomic island-mediated horizontal transfer of the erythromycin resistance gene *erm(X)* among *Bifidobacteria*. *Appl Environ Microbiol*. 2022;88(10):e0041022. <https://doi.org/10.1128/aem.00410-22>
27. Андриященко СВ, Иванова ЕВ, Перунова НБ, Бухарин ОВ. Генетическая характеристика адаптивного потенциала бифидобактерий биотопа дистального отдела кишечника человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;(4):4–11. Andryushchenko SV, Ivanova EV, Perunova NB, Bukharin OV. Genetic characteristics of the adaptive potential of bifidobacteria in the biotope of distal human intestine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;(4):4–11 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-4-11>
28. Mallick S, Das S. Acid-tolerant bacteria and prospects in industrial and environmental applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2023;107(11):3355–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12529-w>
29. Несчислаев ВА, Мокин ПА, Орлова ЕВ, Маслов ЮН, Савина АС. Кислотообразование и кислотоустойчивость пробиотиков. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2020;22(6):34–8. Neschislyayev VA, Mokin PA, Orlova EV, Maslov YuN, Savina AS. Acid formation and acid resistance of probiotics. *Medical & Pharmaceutical Journal "Pulse"*. 2020;22(6):34–8 (In Russ.). EDN: XMXIXI
30. Meghrouh J, Euloge P, Junelles AM, Ballongue J, Petitdémange H. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocins production. *Biotechnol Lett*. 1990;12:575–80. <https://doi.org/10.1007/BF01030755>
31. Bilotta AJ, Cong Y. Gut microbiota metabolite regulation of host defenses at mucosal surfaces: Implication in precision medicine. *Precis Clin Med*. 2019;2(2):110–9. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz008>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещена таблица S1. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565-table-s1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.Б. Перунова** — дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, критическое обсуждение текста рукописи; **О.В. Бухарин** — разработка концепции исследования; **Е.В. Иванова** — дизайн исследования, анализ полногеномного секвенирования исследуемых штаммов, сбор и анализ результатов исследования; **А.В. Бекпергенова** — идентификация выделенных микроорганизмов генетическим методом, биоинформатическая обработка данных, определение антибиотикорезистентности и устойчивости к желудочному соку и желчи, написание текста рукописи; **Т.А. Бондаренко** — исследование антагонистической активности, жизнеспособности, биопленкообразования и антилизоцимной активности бифидобактерий.

Благодарности. Авторы выражают признательность сотрудникам Центра коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН (заведующий, канд. мед. наук, доц. А.О. Плотников) за представленные результаты полногеномного секвенирования штаммов бифидобактерий. Авторы благодарны канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН С.В. Андриященко за работу по размещению секвенированных геномов бифидобактерий в базах данных NCBI GenBank.

Additional information. Table S1 is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-565-table-s1>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.B. Perunova** designed the study, analysed and interpreted the study results, and critically discussed the manuscript. **O.V. Bukharin** conceptualised the study. **E.V. Ivanova** designed the study, analysed the full-genome sequencing of the strains under study, collected and analysed the study results. **A.V. Bekpergenova** identified isolated microorganisms using the genetic method; performed bioinformatics processing of data; measured resistance to antimicrobials, gastric acid, and bile; and drafted the manuscript. **T.A. Bondarenko** studied the antagonistic activity, viability, biofilm formation, and antilysozyme activity of bifidobacteria.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the team of the Center for Collective Use "Persistence of Microorganisms" of the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (and A.O. Plotnikov, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Center for Collective Use) for providing the results of whole-genome sequencing of bifidobacteria strains. The authors also thank S.V. Andryushchenko, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist at the Laboratory of Infectious Symbiology of the Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, for his work in depositing sequenced bifidobacterial genomes into the NCBI GenBank database.

Об авторах / Authors

Перунова Наталья Борисовна, д-р мед. наук, доц., проф. РАН / **Natalia B. Perunova**, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Prof. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>

Бухарин Олег Валерьевич, д-р мед. наук, проф., акад. РАН / **Oleg V. Bukharin**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>

Иванова Елена Валерьевна, д-р мед. наук, доц. / **Elena V. Ivanova**, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>

Бекпергенова Анастасия Владимировна, канд. биол. наук / **Anastasia V. Bekpergenova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5020-2493>

Бондаренко Таисия Александровна, канд. биол. наук / **Taisia A. Bondarenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5186-6865>

Поступила 25.03.2024

После доработки 22.01.2025

Принята к публикации 22.01.2025

Online first 13.05.2025

Received 25 March 2024

Revised 22 January 2025

Accepted 22 January 2025

Online first 13 May 2025