

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ТАКСОНОМІЧНЕ ПОЛОЖЕННЯ БІФІДОБАКТЕРІЙ І СУЧАСНІ МЕТОДИ ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЇ

В огляді наведено літературні дані щодо сучасного стану систематики біфідобактерій. Показано, що точність проведення їх ідентифікації залежить від багатьох факторів: джерела виділення, харчових потреб, умов культивування, освітлено також питання підбору середовища та створення анаеробіозу для оптимального росту цих мікроорганізмів. Описано основні сучасні підходи до ідентифікації біфідобактерій із застосуванням класичних мікробіологічних і новітніх молекулярно-генетичних методів типування мікроорганізмів, описаних в останні роки для детекції і визначення біфідобактерій. У роботі наведено основні джерела інформації з питань систематики, класифікації і номенклатури мікроорганізмів, і зокрема – біфідобактерій, завдяки яким можна дістатися необхідної таксономічної інформації науковцям, які не займаються питаннями систематики.

Ключові слова: біфідобактерії, таксономічне положення, ідентифікація.

Рід *Bifidobacterium* – це одна з груп мікроорганізмів, що мають відношення до медицини, ветеринарії і харчової промисловості. Вони відіграють важливу роль у складі мікробіоценозу людини і тварин. У цьому плані особливої актуальності набуває їх використання у виробництві продуктів функціонального харчування і пробіотичних препаратів. Завдяки високій і різноманітній біологічній активності інтерес до біфідобактерій постійно зростає.

Таксономічне положення біфідобактерій. Систематичне положення біфідобактерій довгий час було предметом дискусій. Відомості щодо вивчення біології цих мікроорганізмів базувалися на даних про їх фізіолого-біохімічні властивості. Тому протягом довгого часу вони були віднесені до різних таксономічних груп: роду *Lactobacillus* [20,33,43,69,72], порядку *Actinomycetales* [24], до коринебактерій [11]. Така різноманітність думок стосовно систематики біфідобактерій привертала увагу дослідників, і в той же час стримувала встановлення їх таксономії. Так, у «Визначнику бактерій і актиноміцетів» Н. Красільнікова (1949) був представлений лише один вид цих мікроорганізмів, включений у рід *Lactobacillus* – *L. bifidus* [5], в 7-му виданні «Керівництва з визначення бактерій» Бергі (1957) біфідобактерії також віднесені до роду *Lactobacillus* [4], хоча ще в 1924 р. S. Orla-Jensen вніс пропозицію визнати існування роду *Bifidobacterium* як самостійного таксону [45]. Автор вважав біфідобактерії ланкою, що поєднує молочнокислі та пропіоновокислі бактерії.

Більш глибокі дослідження біології біфідобактерій дозволили встановити їх домінуючу роль у складі мікрофлори шлунково-кишкового тракту дітей, а також їх позитивний вплив на організм людини [3,9,14,21,57]. В цьому плані підвищився інтерес до систематики цих мікроорганізмів, особливо до їх видового складу. З кишечнику людини різними авторами були виділені і описані нові види біфідобактерій: *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactentis*, *B. liberorum*, *B. longum*, *B. parvulorum* [47], *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. indicum*, *B. globosum* і *B. ruminale* [53] (табл. 1).

Представники роду *Bifidobacterium* і джерела їх виділення
(за даними J.P. Euzéby (<http://www.bacterio.cict.fr>))

Види біфідобактерій	Джерело виділення	Автор, рік*
<i>B. adolescentis</i>	кишечник людини; рубець корови; стічні води; піхва людини	Reuter (1963)
<i>B. angulatum</i>	кишечник людини; стічні води	Scardovi і Crociani (1974)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	кишечник шура, курчати, кроля, теляти, свині; стічні води	Mitsuoka (1969), Scardovi і Trovatelli (1974), Masco <i>зі сніваєм.</i> (2004)
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	ферментоване молоко	Meile <i>зі сніваєм.</i> (1997), Masco <i>зі сніваєм.</i> (2004)
<i>B. asteroides</i>	кишечник <i>Apis mellifera</i>	Scardovi і Trovatelli (1969)
<i>B. bifidum</i>	кишечник дорослої людини, дитини і теляти; піхва людини	Orla-Jensen (1924)
<i>B. boum</i>	рубець корови; кишечник поросяти	Scardovi <i>зі сніваєм.</i> (1979)
<i>B. breve</i>	кишечник дитини і теляти; піхва людини; стічні води	Reuter (1963)
<i>B. catenulatum</i>	кишечник дорослої людини, дитини; стічні води	Scardovi і Crociani (1974)
<i>B. choerinum</i>	кишечник поросяти; стічні води	Scardovi <i>зі сніваєм.</i> (1979)
<i>B. coryneforme</i>	кишечник <i>Apis mellifera</i>	Biavati <i>зі сніваєм.</i> (1982)
<i>B. cuniculi</i>	кишечник кроля	Scardovi <i>зі сніваєм.</i> (1979)
<i>B. dentium</i>	зубний карієс і ротова порожнина людини; кишечник людини; абсцеси і апендикс	Scardovi і Crociani (1974)
<i>B. gallicum</i>	кишечник людини	Lauer (1990)
<i>B. gallinarum</i>	кишечник курчати	Watabe <i>зі сніваєм.</i> (1983)
<i>B. indicum</i>	кишечник <i>Apis cerana</i> і <i>A. dorsata</i>	Scardovi і Trovatelli (1969)
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	кишечник людини і теляти; піхва людини; стічні води	Reuter (1963) Mattarelli <i>зі сніваєм.</i> (2008)
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	кишечник дитини і теляти	Reuter (1963) Mattarelli <i>зі сніваєм.</i> (2008)
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	кишечник поросяти	Matteuzzi <i>зі сніваєм.</i> (1971) Mattarelli <i>зі сніваєм.</i> 2008
<i>B. magnum</i>	кишечник кроля	Scardovi і Zani (1974)
<i>B. merycicum</i>	рубець корови	Biavati і Mattarelli (1991)
<i>B. minimum</i>	стічні води	Biavati <i>зі сніваєм.</i> (1982)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	кишечник дитини і теляти; стічні води	Scardovi <i>зі сніваєм.</i> (1979)
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	кишечник свині, курчати, бика, теляти, шура, морської свинки.	Mitsuoka (1969), Yaeshima <i>зі сніваєм.</i> (1992)
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	кишечник поросяти, теляти, шура, кроля, ягняти; стічні води; рубець корови	Biavati <i>зі сніваєм.</i> (1982) Yaeshima <i>зі сніваєм.</i> (1992)
<i>B. psychraerophilum</i>	кишечник свині	Simpson (2004)
<i>B. pullorum</i>	кишечник курчати	Trovatelli <i>зі сніваєм.</i> (1974)
<i>B. ruminantium</i>	рубець корови	Biavati і Mattarelli (1991)
<i>B. saeculare</i>	кишечник кроля	Biavati <i>зі сніваєм.</i> (1991)
<i>B. subtile</i>	стічні води	Biavati <i>зі сніваєм.</i> (1982)
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	анаеробний реактор	Dong <i>зі сніваєм.</i> (2000) [71]
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	кишечник свині	Zhu <i>et al.</i> (2003)
<i>B. thermophilum</i>	кишечник свині, курчати, теляти; рубець корови; стічні води	Mitsuoka (1969)

* – джерела літератури див. на (<http://www.bacterio.cict.fr>)

Завдяки розвитку молекулярно-генетичних методів (а саме – визначення нуклеотидного складу ДНК і гібридизація ДНК-ДНК) і застосуванню їх у систематиці мікроорганізмів їх класифікація була удосконалена і виявлено нові види роду *Bifidobacterium*, зокрема *B. parvulorum* було віднесено до виду *B. breve*, *B. ruminale* – до виду *B. thermophilum*. Крім того, були відокремлені нові види – *B. dentium*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*. Внаслідок, у 8-му виданні “Керівництва з визначення бактерій” Бергі (1974) сформувався самостійний рід *Bifidobacterium* Oga-Jensen, 1924, що складався з 11 видів і включений в родину *Actinomycetaceae* [4]. У 1986 р. в 9-му виданні „Керівництва з визначення бактерій” Бергі рід *Bifidobacterium* був віднесений до 15-ї частини “Irregular nonsporng gram-positive rods” («Грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми») разом із 22 аеробними, факультативно анаеробними і строго анаеробними родами бактерій, без об’єднання в будь-яку родину. Він містив 24 види з типовим видом *Bifidobacterium bifidum* [53].

Розширення діапазону видових назв біфідобактерій пов’язано з поглибленим вивченням геному багатьох мікроорганізмів, у тому числі і біфідобактерій, появою більш сучасних молекулярно-генетичних методів ідентифікації (сиквенування геному, застосування поліфазної таксономії тощо). Так, за останні 20 років після опублікування 9-го “Керівництва з визначення бактерій” Бергі були запропоновані види: *B. gallicum*, *B. scardovii*, *B. inopinatum*, *B. denticolens*, ізольовані від людини [15,25,34], *B. thermacidophilum*, виділений з анаеробного ферментера [17,71], *B. psychrophilum*, виділений із кишечника свині [55], *B. tsurumiense* виділений із зубного карієсу ховрашка [44] та ін.

Аналіз даних літератури про структуру ДНК представників різних видів роду *Bifidobacterium* говорить про їх гетерогенність. Так, було показано, що вони характеризуються широкими коливаннями в нуклеотидному складі ДНК. Наприклад, вміст ГЦ-пар у ДНК варіює від 42 % до 67 % [10]. І. Блохіна зі співавторами ще в 1995 р. відмічали, що необхідно переглянути класифікацію роду *Bifidobacterium*, тому що він став “громіздким”, і пропонували підвищити його статус до родини *Bifidobacteriaceae fam. nov.* [1]. Застосування новітніх методів дослідження властивостей бактерій на молекулярному рівні дозволило підійти з позиції філогенії до розуміння місця біфідобактерій серед інших мікроорганізмів. Stackebrandt зі співавторами [56], підсумовуючи одержані раніше дані аналізу будови гену 16S рибосомної РНК, запропонували нову класифікаційну структуру біфідобактерій, де вони відносяться до класу *Actinobacteria*, порядку *Bifidobacteriales*, і утворюють родину *Bifidobacteriaceae*, типовий рід – *Bifidobacterium*.

Крім того, в родину *Bifidobacteriaceae* був включений рід *Gardnerella* з типовим видом *G. vaginalis*, а також нові роди біфідобактерій – *Aeriscardovia* з типовим видом *A. aeriphila*, *Scardovia* з типовим видом – *S. inopinata*, *Parascardovia* з типовим видом – *P. denticolens* та *Alloscardovia* з типовим видом *Alloscardovia omnicoles* [26,28,55,58].

Таблиця 2

Нові роди біфідобактерій і їх представники
(за даними J.P. Euzéby (<http://bacterio.cict.fr>))

Рід, вид біфідобактерій	Джерело виділення	Автор, рік
<i>Parascardovia denticolens</i>	зубний карієс людини	Crociani зі співавт. (1996) Jian , Dong (2002)
<i>Scardovia inopinata</i>	зубний карієс людини	Crociani зі співавт. (1996) Jian , Dong (2002)
<i>Aeriscardovia aeriphila</i>	кишечник свині	Simpson (2004)
<i>Alloscardovia omnicoles</i>	клінічні зразки від людей	Huys (2007)

* – джерела літератури див. на (<http://bacterio.cict.fr>)

Таким чином, на даний час родина *Bifidobacteriaceae* включає в себе 5 родів (не враховуючи рід *Gardnerella*), які складаються з 32 видів біфідобактерій (табл. 1, 2).

Особливості культивування біфідобактерій. Відомо, що точність проведення ідентифікації мікроорганізмів залежить від багатьох факторів, серед яких одним із найважливіших є їх культивування в оптимальних умовах [22]. Зважаючи на це, при розробці живильних середовищ

для культивування біфідобактерій дуже важливо, щоб вони містили поживні і ростові речовини в доступній формі. Потреби біфідобактерій у поживних речовинах великі і різноманітні. J. Hassinen зі співавторами показали, що ці мікроорганізми потребують таких речовин як біотин, рибофлавін, пантотенова кислота. Автори відмічають необхідність для оптимального розвитку біфідобактерій таких факторів росту, як пуринові і піримідинові основи, пептиди, цистеїн, аміноцукри та ін. [23].

З огляду на фізіологічні потреби біфідобактерій, із моменту відкриття цих мікроорганізмів було розроблено багато варіантів живильних середовищ для їх виділення і культивування [11, 49, 69]. Зазвичай вони містять складові, що поставляють їм речовини, які самі не здатні синтезувати – гідролізат казеїну, екстракт печінки, дріжджовий автолізат і інші інгредієнти. Семеніхіна показала, що виділення біфідобактерій зручно проводити на середовищах Блаурока і Хенеля [4]. Г. Гончарова для виділення і культивування *B. bifidum* рекомендувала модифіковане нею середовище Блаурока [2].

Аналіз літератури показує, що на даний час найбільш відомими середовищами для культивування біфідобактерій є триптиказо-фітон-дріжджове середовище (ТРУ), середовище MRS з цистеїном, середовище Блаурока, мізково-печінкове середовище тощо [13, 49, 53]. Для створення селективних умов часто використовують такі речовини, як антибіотики (канаміцин, паромоміцин, параміцин, налідиксова кислота, поліміксин В, неоміцин), пропіонова кислота, літію хлорид та ін. За даними літератури більшість відомих штамів біфідобактерій в основному виділені з молочних продуктів і кишечника людини, стійкі до цих антимікробних сполук. У той самий час, при виділенні біфідобактерій з інших природних джерел доцільніше використовувати неселективні компоненти середовища, оскільки селективні речовини можуть пригнічувати ріст цих мікроорганізмів.

При культивуванні біфідобактерій, крім складу поживного середовища, велику роль відіграє створення анаеробних умов. У досліджах J.-В. Ahn зі співавторами [7] з вивчення ефекту кисневого стресу на *B. longum* було показано, що за присутності кисню подовжується лаг-фаза і затримується клітинний ріст. Крім того, змінюється морфологія клітин (вони видовжуються), спостерігається неповний клітинний поділ, змінюється профіль клітинних жирних кислот тощо. Тому створення анаеробіозу, який забезпечував би оптимальний ріст біфідобактерій, має велике значення і для проведення точної ідентифікації. Протягом багаторічних досліджень анаеробних мікроорганізмів було використано багато методів для їх культивування – від придонного вирощування під високим стовпчиком рідкого середовища до конструювання спеціальних анаеробних термостатів, які можна заповнити потрібними сумішами газів (водень, азот, CO₂, аргон тощо). При підборі методів анаеробного культивування слід враховувати і такі критерії, як простота створення анаеробних умов і мінімум необхідного обладнання для проведення досліджень. В останні роки було показано, що найбільш прийнятними анаеробними умовами для культивування досліджуваних штамів біфідобактерій є анаеробні системи типу Gas Pak [6]. Прості у застосуванні, вони створюють необхідну для росту біфідобактерій атмосферу і забезпечують максимальне виживання клітин цих мікроорганізмів. Крім того, автори відмічають, що у дослідженнях щодо культивування біфідобактерій, в яких використовується лише рідке середовище, можна застосовувати і апарат Аристовського.

Класичні методи ідентифікації біфідобактерій. Традиційно штами біфідобактерій ідентифікують за такими морфолого-культуральними ознаками: морфологія клітин і колоній, забарвлення за Грамом, здатність рости лише в анаеробних умовах, рухливість клітин, каталазна та нітратазна активність, утворення газу із глюкози, визначення кінцевих продуктів метаболізму, за спектром засвоюваних цукрів, а також за наявністю фруктозо-6-фосфат фосфокетолази – ключового ферменту метаболізму, який є таксономічним маркером для усієї родини *Bifidobacteriaceae* [4, 14, 53]. Нажаль, усі ці методи мають низьку ступінь відтворюваності, пов'язану з різними умовами культивування культур у різних лабораторіях, а також із варіаціями властивостей штамів всередині одного виду.

Молекулярно-генетичні методи виявлення й ідентифікації біфідобактерій. В останні роки все більш загальноживаною стає ідентифікація мікроорганізмів із використанням генетичних методів. З появою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стала можливою розробка різних варіантів праймерів для визначення багатьох видів роду *Bifidobacterium*

на основі будови генів рибосомної РНК. Внаслідок детального аналізу гену 16S рРНК і 16S-23S спейсерної ділянки було виявлено специфічні відмінності, характерні для різних таксономічних рівнів біфідобактерій: роду, виду, підвиду і штаму [8].

Даний факт був використаний для конструювання видо- і групспецифічних праймерів для виявлення й ідентифікації цих мікроорганізмів. Так, R. Satokari зі співавторами [52], P. Kaufmann зі співавторами [30] розробили праймери для ідентифікації біфідобактерій на рівні роду. В роботах W. Jian і X. Dong, T. Matsuki зі співавторами, P. Brigidi зі співавторами описані видоспецифічні праймери для діагностики видів біфідобактерій, що є найбільш розповсюдженими у шлунково-кишковому тракті людини, а також тих, що застосовуються при виготовленні продуктів функціонального харчування і пробіотичних препаратів [12, 29, 40, 41, 42]. Нарешті, методом ПЛР вдалося розпізнати близькосторіднені види, наприклад *B. infantis* і *B. longum*, *B. angulatum* і *B. catenulatum* [39, 70].

Ventura зі співавторами розробили праймери, комплементарні до 16S-23S спейсерної ділянки для ідентифікації *B. animalis subsp. lactis* – виду біфідобактерій, виділеного зі шлунково-кишкового тракту тварин, який застосовується у складі біопродуктів [60]. Дана методика також дозволяє чітко відрізнити даний вид від близькосторідненого йому *B. animalis subsp. animalis*.

Для аналізу видової композиції біфідобактерій Dong зі співавт. [16] застосували метод мультиплекс-ПЛР, який дозволяє ідентифікувати одночасно 5 видів цих мікроорганізмів: *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve* і *B. bifidum*. Завдяки використанню в ПЛР одразу 5 видоспецифічних праймерів до гену 16S рРНК у комбінації з родоспецифічним зворотнім праймером, розробленим Kaufmann зі співавторами [30], можна ідентифікувати дані види в моно- або змішаній культурі. Kwon зі співавторами вдалося розробити метод мультиплекс-ПЛР, завдяки якому можна успішно ідентифікувати вже 8 біфідобактеріальних штамів [32]. M. Ventura зі співавторами запропонували мультиплекс-ПЛР для ідентифікації *B. lactis* [66].

Для виявлення й ідентифікації біфідобактерій було описано і багато інших молекулярних маркерів: ген трансальдолази [46], ген L-лактат дегідрогенази (*ldh*) [48], ген *recA* білку (*recA*) [18, 31, 59], ген 60kDa білка теплового шоку (HSP60) [28, 29], ген фактору елонгації Tu (*tuf*) [35, 36, 59], ген *atpD* [62], ген *groEL* [38] та ін. Крім того було показано, що аналіз послідовностей цих консервативних генів дає можливість точніше визначити місце мікроорганізму в еволюційному процесі. Так, для дослідження біфідобактерій, Ventura зі співавторами [61] застосували метод ПЛР із використанням мультилокусної методики. Для цього авторами було сиквеновано сім консервативних генів: *clpC*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaJ1*, *pufF*, *proC* і *xpf* з кожного описаного на даний час типового штамму роду *Bifidobacterium*. Застосування такого мультилокусного аналізу дозволило значно підвищити дискримінаційну здатність між такими таксонами, як рід, вид, штам, а також уточнити філогенетичну спорідненість всередині роду *Bifidobacterium*.

Ідентифікація мікроорганізмів на генетичному рівні з використанням специфічних праймерів має певні переваги порівняно з мікробіологічними методами. Окрім високої їх чутливості і точності, для проведення молекулярно-генетичних методів ідентифікації популяція бактерій не обов'язково повинна бути фізіологічно активною і навіть живою. Достатньо, щоб їх нуклеїнова кислота залишалась інтактною, а це робить процес ідентифікації значно простішим і коротшим.

Слід однак зазначити, що на даний час праймери розроблені не для всіх існуючих видів біфідобактерій, а здебільшого лише для видів, що використовуються для виробництва пробіотичних препаратів і біопродуктів. Це значно обмежує використання класичного методу ПЛР у вивченні таксономії біфідобактерій. Для ідентифікації інших видів роду *Bifidobacterium*, окрім класичних методів, визначення вмісту ГЦ-пар і гібридизації ДНК-ДНК, можна використовувати додаткові методи, описані нижче.

Гель-електрофорез у пульсуючому полі (Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)). PFGE вважається “золотим стандартом” методів молекулярного типування. Для його проведення бактеріальні ізоляти, вирощені в рідкому і на твердому середовищі, змішують із розплавленою агарозою і розливають у маленькі формочки. Внаслідок утворюються агарозні пластинки, які містять інтактні клітини бактерій. Далі їх піддають *in situ* детергент-

ферментативному лізису і дії ферментів рестрикції. Вибір рестриктаз, які використовуються для PFGE, зазвичай відбувається на основі їх здатності розрізати хромосому ДНК по певних сайтах на невелику кількість фрагментів. Для бактерій із високим вмістом G+C (до яких відносяться і біфідобактерії) були вибрані рестриктази, які впізнають послідовності, багаті на вміст А і Т нуклеотидів, такі як *SpeI* (ACTAGT) або *XbaI* (TCTAGA) [50]. Оброблені пластинки з ДНК бактерій піддаються електрофорезу в агарозному гелі в приладі, в якому полярність струму змінюється через заданий інтервал часу. В результаті на електрофореграми для кожного ізолята отримують індивідуальний профіль із фрагментів ДНК. За допомогою PFGE були встановлені розміри геному для видів *B. breve* і *B. longum*, які варіювали від 1,3 до 2,2 Mb [50]. Подальший аналіз одержаних даних дозволив авторам виявити три різні геномні PFGE профілі для штамів *B. breve*, п'ять – для штамів *B. infantis* і *B. bifidum*, і три – для штамів *B. longum*, завдяки чому дані види були поділені на різні молекулярні типи.

Метод PFGE є дуже чутливим, тобто дозволяє проводити ідентифікацію з високою точністю і відтворюваністю, але займає багато часу, що обмежує кількість ідентифікованих ізолятів.

Аналіз випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (Random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay). Метод RAPD оснований на використанні коротких праймерів із випадковою послідовністю, довжиною 9–10 нуклеотидних пар, які гібридизуються або частково гібридизуються з ДНК-мішенню й ініціюють ампліфікацію ділянок бактеріального геному. Кількість і місцезосташування таких випадкових олігонуклеотидних сайтів варіює у різних штамів різних видів. Таким чином, внаслідок подальшого розділення продуктів ампліфікації методом електрофорезу в агарозному гелі, для кожного зразка можна отримати індивідуальний малюнок із фрагментів ДНК, який теоретично є характеристикою певного бактеріального штаму. Даний метод дозволяє диференціювати штами як одного виду, так і різних видів. Наприклад, за допомогою RAPD-типуювання вдалося охарактеризувати штами біфідобактерій із кишечнику щура [19], визначити штами видів *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve* [68].

Риботипування (Ribotyping assay). Метод риботипування дозволяє суттєво зменшити кількість фрагментів ДНК, що аналізуються. Він направлений на виявлення у штамів, що вивчаються, відмінностей у кількості рибосомних оперонів, а також рестрикційного поліморфізму їх нуклеотидних послідовностей. Для цього продукти рестриктазного гідролізу бактеріальної ДНК розділяються методом електрофорезу в агарозному гелі, а потім гібридизуються з ДНК-зондами. (Такі зонди являють собою гени, що кодують рРНК, вони мають здатність гібридизуватися з бактеріальною рДНК.) Даний метод може бути застосований як для встановлення видової належності ізолятів, так і для їх внутрішньовидової класифікації. Часто, у випадку неефективного аналізу звичайного рестрикційного профілю ДНК, риботипування дозволяє розрізнити штами одного і того ж серотипу в межах виду. Так, за допомогою застосування методу риботипування стало можливим охарактеризувати *B. longum*, *B. infantis* і *B. suis*, де було показано, що відмінності в риботипах між цими видами є досить малі, що дозволило об'єднати ці видові таксони в один [51]. Цікавість викликають дослідження, які провели I. Mangin зі співавторами [37], виявивши штамову різномайття біфідобактерій кишечнику людини у чотирьох волонтерів після пеніцилінової терапії. Методом гібридизації рибосомного 23S ДНК зонду на *EcoRV*-оброблену хромосому ДНК було виявлено існування значного різномайття штамів біфідобактерій між пацієнтами, а також встановлено, що біфідофлора є відносно стабільною за штамовим складом.

ПЛР ентеробактеріальних повторюваних міжгеномних узгоджених послідовностей (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences (ERIC) – PCR). У 1991 р. Versalovic зі співавторами [67] описали метод типуювання для дослідження так званих “фінгерпринтів” (fingerprint – англ. “відбиток пальця”) бактеріальних геномів шляхом аналізу специфічних профілів, одержаних після ампліфікації повторюваних елементів ДНК, наявних у бактеріальному геномі. ERIC послідовності являють собою елементи ДНК, довжиною 126 пар основ, містять центральний інвертований повтор і розташовані в бактеріальному геномі. ERIC – ПЛР має значний потенціал як швидкий метод, що відповідає необхід-

ним критеріям (специфічність і чутливість). Більше того, він дозволяє одночасно оперувати великою кількістю ізолятів і порівнювати їх, оминаючи стадію бактеріального культивування. Застосування ERIC – ПЛР методу для ідентифікації біфідобактерій було представлено у роботах [54, 64]. Було показано, що ERIC – ПЛР можна використовувати не лише для філогенетичного і таксономічного аналізу, але й для дослідження видової композиції змішаних біфідобактеріальних культур. Також встановлено, що даний метод дозволяє розділити ті види біфідобактерій, які виявляють велику філогенетичну спорідненість (*B. catenulatum* – *B. pseudocatenulatum*, *B. infantis* – *B. suis* – *B. longum*), а також диференціювати близько споріднені таксони біфідобактерій (*B. lactis* – *B. animalis*) [60].

Рестрикційний аналіз ампліфікованих рибосомних ДНК (amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)). Даний метод являє собою аналіз поліморфізму довжин фрагментів рестрикції ампліфікованих генів. Вся рДНК або її частина ампліфікується методом ПЛР і одержані фрагменти розрізаються ферментами рестрикції. Число і розмір одержаних фрагментів ДНК варіює, залежно від сайтів рестрикції всередині даної специфічної рДНК (а також від кількості рРНК кодуєчих оперонів на хромосомі) і, таким чином, внаслідок можна отримати профіль, специфічний до даної послідовності. Ventura зі співавторами, застосувавши метод ARDRA, показали, що з використанням рестриктаз *Sau3AI* або *VamHI* до ампліфікованої послідовності 16S рДНК можна ідентифікувати 14 з 16 видів біфідобактерій [63].

Таким чином, застосування молекулярно-генетичних методів для виявлення і ідентифікації біфідобактерій дозволяє точніше класифікувати ці мікроорганізми, а також оцінити еволюційну спорідненість між ізолятами.

Джерела інформації для таксономістів. Як видно з вищезазначеного, ідентифікація, і зокрема, ідентифікація біфідобактерій – це складний багатоступеневий процес, який, окрім фундаментального значення, має дуже важливий прикладний аспект: таксономія створює спільну мову для спілкування науковців, які працюють із мікроорганізмами, а також має велике значення для промислового застосування мікроорганізмів (наприклад, маркування продуктів). Таксономія мікроорганізмів постійно змінюється, поповнюється новими даними. Тому, доцільно буде коротко пояснити, як дістатися необхідної таксономічної інформації науковцям, які не займаються питаннями систематики.

Організацією, яка слідкує за номенклатурою прокариотів, є *Міжнародний комітет з систематики прокариотів (International Committee on Systematics of Prokaryotes)* (www.the-icsp.org). Він визначає ті правила, за якими називають прокариоти. Усі правила зібрані в *Бактеріологічному коді (Bacteriological Code)* [27]. Останній містить *Правила* (обв'язкові) і *Рекомендації* (лише поради) щодо номенклатури бактеріальних таксонів.

Таксономічні питання певних груп мікроорганізмів розподілені між кількома підкомітетами. Наприклад, питаннями систематики біфідобактерій займається *Підкомітет з таксономії біфідобактерій, лактобацил і споріднених мікроорганізмів*. Основою цього комітету є *Виконавча комісія*, яка приймає рішення щодо таксономічних питань, ревізії *Бактеріального коду* тощо.

Офіційно визначеним журналом, у якому публікуються статті з таксономії (наприклад, характеристика нових видів/нових родів), є *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)* (<http://ijs.sgmjournal.org>). Усі нові назви обов'язково мають бути опубліковані в IJSEM – або описані в ньому, або, у разі опублікування в іншому джерелі, розміщені в IJSEM у «Затверженому списку» (Validation List). Таким чином, назви усіх мікроорганізмів можна знайти в одному журналі, навіть якщо їх таксономічна характеристика представлена де-небудь в іншому місці.

Бактеріальна номенклатура може бути перевірена онлайн на сайті *Німецької колекції мікроорганізмів і клітинних культур (German collection of microorganisms and cell cultures, DSMZ)*; <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname/htm>, а також на сайті, який підтримується J.P. Euzéby (<http://www.bacterio.cict.fr>) і оновлюється після виходу кожного номера IJSEM.

Для класифікації мікроорганізмів базовим джерелом є «*Керівництво з систематики бактерій*» Bergey (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*). У 2001 р. вийшло його нове видання, в якому представлені дані про генотипові і фенотипові риси усіх відомих так-

TAXONOMIC POSITION OF BIFIDOBACTERIA AND MODERN METHODS FOR THEIR IDENTIFICATION

Summary

Literature data, concerning current state of taxonomy of microorganisms of genus *Bifidobacterium* are presented in the review. The question of creation of necessary conditions for accurate identification of these bacteria has been revealed, as well as the basic principles of novel molecular-genetic approaches for microorganisms' typing (as they are used for the detection and identification of bifidobacteria) have been described. Main information sources in systematics, classification and nomenclature have been listed.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: bifidobacteria, taxonomic position, identification

The author's address: O.A.Poltavska, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Блохина И.Н., Леванова Г.Ф., Лихачева А.Ю. Подходы к классификации бифидобактерий на основе данных о структуре их ДНК // Мол. ген. микробиол. вирусол. – 1995. – № 4. – С. 27–29.
2. Гончарова Г.И., Козлова Е.П., Лянная А.М., Зацепин Ю.К. Новый советский препарат, сухой бифидобактерин и его эффективность при кишечных заболеваниях у детей // Педиатр. акуш. гинек. – 1974. – № 4. – С. 22–23.
3. Каширская Н.Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры // Рус. мед. журн. – 2000. – № 13–14. – С. 22–29.
4. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – Москва: Наука, 1975. – 384 с.
5. Красильников Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов. – Москва-Ленинград: Изд-во АН СССР, 1949. – 830 с.
6. Полтавська О.А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2006. – 21 с.
7. Ahn J.-B., Hwang H.J., Park J.-H. Physiological responses of oxygen tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen // J. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – **11**, N 3. – P. 443–451.
8. Belkum A., Struelens M., Visser A. et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology // Clin Microbiol. Rew. – 2001. – **14**, N 3. – P. 547–560.
9. Bengmark S. Colonic food: pre- and probiotics // The American Journal of Gastroenterology. – 2000. – **95**, N 1. – P. S5–S7.
10. Biavatti B., Vescovo M., Torriani S., Botazzi V. Bifidobacteria: ecology, physiology and applications // Ann. Microbiol. – 2000. – **50**, N 1. – P. 117–131.
11. Blaurock G. Bifiduszuchtung auf zystinhaltigen Nahrboden // Zentralbl. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. – 1939. – **144**, N 1. – P. 75–79.
12. Brigidi P., Vstali B., Swennen E. et al. Specific detection of *Bifidobacterium* strains in a pharmaceutical probiotic products and in human feces by polymerase chain reaction // System. Appl. Microbiol. – 2000. – **23**, N 2. – P. 391–399.
13. Charteris W.P., Kelli P.K., Morelli L., Collins J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional foods // Int. J. of Dairy Techn. – 1998. – **51**, N 4. – P. 23–37.
14. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut // Am. J. Clin. Nutr. – 1999. – **69**, N 1 (suppl). – P. 1052S–1057S.
15. Crociani F., Biavati B., Alessandrini A. et al. *Bifidobacterium inopinatu* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1996. – **46**, N 2. – P. 564–571.
16. Dong X., Cheng G., Jian W. Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers // Syst. Appl. Microbiol. – 2000. – **23**, N 3. – P. 386–390.
17. Dong X., Xin Y., Jian W. et al. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from anaerobic digester // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – **50**, N 1. – P. 119–125.
18. Eisen J.A. The recA protein as a model molecular for systematic studies of bacteria: comparison of trees of recAs and 16S rRNAs from the same species // J. Mol. Evol. – 1995. – **41**, № 6. – P. 1105–1123.
19. Fanedl L., Nekrep F.V. and Augustin G. Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans // Can. J. Microbiol. – 1998. – **44**, N 11. – P. 1094–1101.
20. Gillenberg H.H.G. A note on the taxonomy of *Lactobacillus bifidus* // Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. – 1958. – **5**, N 4. – P. 161–164.
21. Guarner F., Malagelada J.-R. Gut flora in health and disease // The Lancet. – 2003. – **361**, N 9356. – P. 512–519.
22. Guidelines for the evaluation of probiotics in food // Report of Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. – London, 2002. – P. 3–56.
23. Hassinen J.B., Durbin G.T., Tomarelli R.M., Bernhart F.W. The minimal nutrition requirements of *Lactobacillus bifidus* // J. Bacteriol. – 1951. – **13**, N 2. – P. 292–294.
24. Hayward A.C., Hale C.M.F., Bisset K.A. The morphology and relationships of *Lactobacillus bifidus* // J. Gen. Microbiol. – 1955. – **13**, N 2. – P. 292–294.

25. Hoyles L., Inganas E., Falsen E. et al. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – **52**, N1. – P. 995–999.
26. Huys G., Vancanneyt M., D'Haene K. et al. *Alloscardovia omnicoles* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – **57**, N 7. – P. 1442–1446.
27. International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision) // Bacteriological Code / Edited by Lapage S.P., Sneath P.H.A., Lessel E.F. et al. – Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.
28. Jian W., Dong X. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov. and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – **56**, N 4. – P. 809–812.
29. Jian W., Zhu L. and Dong X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences // Int. J. Syst. Env. Microbiol. – 2001. – V. 51, № 5. – P. 1633–1638.
30. Kaufmann P., Pfefferkorn A., Teuber M., Meile L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – **63**, N 4. – P. 1268–1273.
31. Kullen M.J., Brady L.J. and O'Sullivan D.J. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine // FEMS Microbiol. Letters. – 1997. – **154**, N 2. – P. 1029–1033.
32. Kwon H.-S., Yang E.-H., Lee S.-H. et al. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region from 16S rRNA through 23S rRNA // FEMS Microbiol. Letters. – 2005. – **250**, N 1. – P. 55–62.
33. Lambert R., Zilliken F. A novel growth factor for *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* // Arch. Biochem. Biophys. – 1965. – **110**, N 5. – P. 544–550.
34. Lauer E. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1990. – V.40, №1. – P. 100–102.
35. Ludwig W., Neumaier N., Klugbauer N. et al. Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta subunit genes // Antonie van Leeuwenhoek. – 1993. – **64**, N 3–4. – P. 285–305.
36. Ludwig W., Weizenegger M., Beltz D. et al. Complete nucleotide sequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor Tu: functional, structural and phylogenetic evaluations // Arch. Microbiol. – 1990. – **153**, N 3. – P. 241–247.
37. Mangin I., Bouhnik Y., Bisetti N. et al. Identification of *Bifidobacterium* strains by rRNA gene restriction patterns // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – **60**, N 5. – P. 1451–1458.
38. Masco L., Ventura M., Zink R. et al. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* comb. nov. and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – **54**, N 4. – P. 1137–1143.
39. Matarelli P., Bonaparte C., Pot B. and Bivattini B. Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – **58**, N 4. – P. 767–772.
40. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J. et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – **68**, N 5. – P. 5445–5451.
41. Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V.65, N10. – P. 4506–4512.
42. Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria // Curr. Issues Intest. Microbiol. – 2003. – **4**. – P. 61–69.
43. Norris R.F., Flanders T., Tomarelli R.M., Gyorgy P. Occurrence of mucoid variant of *Lactobacillus bifidus* (Tissier). A comparison of branched and unbranched strains // J. Bacteriol. – 1950. – **60**, N 9. – P. 681–696.
44. Okamoto M., Benno Y., Leung K.-P. and Maeda N. *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – **58**, N 1. – P. 144–148.
45. Orla-Jensen S. La classification des bacteries lactiques // Lait. – 1924. – N 4. – P. 468–474.
46. Requena T., Burton J., Matsuki N., et al. Identification, detection and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68, N 5. – P. 2420–2427.
47. Reuter G. Designation of type strains for *Bifidobacterium* species // Int. Journ. Syst. Bacteriol. – 1971. – **21**, N 4. – P. 273–275.
48. Roy D. and Sirois S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short region of the *ldh* gene // FEMS Microbiol. Letters. – 2000. – **191**, N 1. – P. 17–24.
49. Roy D. Media for isolation and enumeration of *Bifidobacteria* in dairy products // Int. J. of Food Microbiol. – 2001. – **69**, N 1. – P. 167–182.
50. Roy D., Ward P. and Champagne G. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed field gel electrophoresis and polymerase chain reaction // Int. J. Food Microbiol. – 1996. – **29**, N 1. – P. 11–29.
51. Sakata S., Kitahara M., Sakamoto M. et al. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – **52**, N 6. – P. 1945–1951.
52. Satokari R.M., Vaughan E.E., Akkermans A.D. et al. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gel electroforesis // Appl. and Environ. Microbiol. – 2001. – **67**, N 2. – P. 504–513.

53. Scardovi V. Genus *Bifidobacterium*. Orla-Jensen // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. – P. 1418–1434.
54. Shuhaimi M., Ali A.M., Saleh N.M. and Yazid A.M. Utilization enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences (ERIC) sequences-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria // Biotech. Letters. – 23, N 9. – P. 731–736.
55. Simpson P.J., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. *Bifidobacterium psychrophilum* sp nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – 54, N 2. – P. 401–406.
56. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – 47, N 10. – P. 4479–4491.
57. Stanton C., Desmond C., Coakley M., et al. Challenges facing Development of Probiotic-Containing Functional Foods // Handbook of Fermented Functional Foods / Edited by Farnworth E.R. – CRC Press LLC, 2003. – P. 28–49.
58. *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community* / Edited by Stackebrandt S. P. – New York, NY: Springer-Verlag, 2000.
59. Ventura M. and Zink R. Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes, as well as RFLP of the ITS-sequences supplies additional tools to discriminate *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – N 69, 12. – P. 7517–7522.
60. Ventura M. and Zink R. Rapid identification, differentiation and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis* // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – N 68, 12. – P. 6429–6434.
61. Ventura M. Canchaya C., Del Casale A. et al. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – 56, N 12. – P. 2783–2792.
62. Ventura M., Canchaya C. van Sinderen D. et al. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the *atp* (*atpBEFHAGDC*) operon, its genetic structure, characterisation and phylogenetic analysis // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70, N 5. – P. 3110–3121.
63. Ventura M., Elli M., Pemiero R. and Zink R. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) // FEMS Microbiol. Ecol. – 2001. – 36, N 2–3. – P. 113–121.
64. Ventura M., Meilan V. and Zink R. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69, N 7. – P. 4296–4301.
65. Ventura M., O'Flaherty S., Claesson M.J. et al. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics // Nature Reviews/Microbiol. – 2009. – 7, N 1. – P. 61–71.
66. Ventura M., Remiero R., Zink R. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by combined multiplex-PCR approach // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – 67, N 2. – P. 2760–2765.
67. Versalovic J., Koeuth T. and Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // NAR. – 19, N 24. – P. 6823–6831.
68. Vincent D., Roy D., Mondou F. and Dery C. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification // Int. J. Food Microbiol. – 1998. – 43, N 3. – P. 185–193.
69. Weiss J.E., Rettger L.F. *Lactobacillus bifidus* // J. Bacteriol. – 1934. – V. 28. – P. 501–521.
70. Youn S.Y., Seo J.M., Ji G.E. Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium* species // Lett. Appl. Microbiol. – 2008. – 46, N 1. – P. 7–13.
71. Zhu L., Li W., Dong X. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HS60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* sbsp. *porcinum* sbsp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – 53, N 6. – P. 1619–1623.
72. Enzymatic synthesis of a growth factor for *Lactobacillus bifidus* var. *Penn.* // J. Biol. Chem. – 1954. – 208, N 2. – P. 299–305.

Отримано 15.11.2008