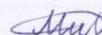


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Минлигареева Елена Вячеславовна

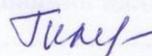
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФОРМИРОВАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ
АУТОШТАММОВ *BIFIDOBACTERIUM spp* И СОЗДАНИЕ НОВЫХ
ПРОБИОТИКОВ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ КОРРЕКЦИИ
МИКРОБИОТЫ

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук,

и.о. заведующего кафедрой фундаментальной

и прикладной микробиологии



Гимранова И.А.

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Численность и разнообразие кишечных <i>Lactobacillus</i> spp.	11
1.2. Методы идентификации <i>Lactobacillus</i> spp.	13
1.3. Биологические свойства аутоштаммов <i>Lactobacillus</i> spp.	14
1.3.1. Адгезия к эпителиальным клеткам кишечника	15
1.3.2. Биопленки	16
1.3.3. Антимикробная активность	17
1.3.4. Биосовместимость	18
1.4. Роль <i>Lactobacillus</i> spp. при различных заболеваниях	20
1.4.1. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)	20
1.4.2. Синдром раздраженного кишечника (СРК) и воспалительное заболевание кишечника (ВЗК)	21
1.4.3. Ревматоидный артрит (РА)	21
1.4.4. Диабет 1 типа (СД1) и ожирение	22
1.4.5. Рассеянный склероз (РС)	23
1.4.6. Когнитивное развитие и поведение	23
1.5. Пробиотики	24
1.6. Биобезопасность и промышленное производство пробиотиков	27
1.7. Аутопробиотики	28
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1. Объекты исследования и материалы	32
2.2. Методы исследования	33
2.2.1. Методика бактериологического исследования толстого кишечника	33
2.2.2. Выделение чистой культуры аутоштамма <i>Lactobacillus</i> spp.	34

2.2.3. Контроль полученного аутоштамма лактобактерий	36
2.2.4. Определение титра КОЕ лактобацилл	37
2.2.5. Посев на плотные питательные среды (метод Коха) для лактобактерий микроаэрофилов	37
2.2.6. Идентификация выделенных клонов аутоштаммов лактобактерий	39
2.2.6.1. MALDI-TOF масс-спектрометрия	39
2.2.6.2. Идентификация штаммов до вида методом ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)	40
2.2.7. Адгезия <i>Lactobacillus</i> spp. к буккальному эпителию	41
2.2.8. Определение кислотообразующей активности аутолактобактерий	43
2.2.9. Антагонистическая активность аутолактобактерий	44
2.2.9.1. Метод перпендикулярных штрихов	45
2.2.9.2. Метод блоков для определения антагонистической активности аутолактобактерий	46
2.2.10. Определение чувствительности <i>Lactobacillus</i> spp. к антибактериальным препаратам (АБП)	47
2.2.11. Определение биосовместимости выделенных аутоштаммов <i>Lactobacillus</i> spp.	48
2.2.12. Анализ биопленок, формируемых на инертных поверхностях	48
2.2.13. Определение эмульгирующих свойств выделенных аутоштаммов	49
2.2.14. Статистический анализ	50
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	
3.1. Выделение и идентификация аутоштаммов <i>Lactobacillus</i> spp. по культурально-морфологическим признакам культур	51
3.2. Контроль выделенных аутоштаммов лактобактерий	53
3.3. Идентификация аутоштаммов <i>Lactobacillus</i> spp.	59
3.3.1. MALDI-TOF масс-спектрометрия	59

3.3.2. Видовое разнообразие и секвенирование выделенных <i>Lactobacillus</i> spp.	61
3.4. Изучение адгезивных свойств штаммов <i>Lactobacillus</i> spp. к буккальному эпителию человека	64
3.5. Антагонизм и кислотообразующая активность аутоштаммов	67
3.5.1. Определение антагонистической активности аутолактобактерий методом блоков и штрихов	67
3.5.2. Определение антагонистической активности аутолактобактерий методом перпендикулярных штрихов	68
3.5.3. Изучение кислотообразующей активности <i>Lactobacillus</i> spp.	75
3.6. Изучение антибиотикоустойчивости аутоштаммов <i>Lactobacillus</i> spp.	76
3.7. Биосовместимость аутоштаммов <i>Lactobacillus</i> spp.	81
3.8. Анализ биопленок, формируемых на инертных поверхностях аутоштаммами <i>Lactobacillus</i> spp.	87
3.9. Определение эмульгирующих свойств выделенных аутоштаммов	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ВЫВОДЫ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96

Список сокращений и условных обозначений

SIV – вирус иммунодефицита обезьян	КОЕ – колониобразующая единица
АБП – антибактериальный препарат	КТМ – кларитромицин
АКЦ – амоксициллин	ЛЕВ – левомицетин
АМП – ампициллин	ЛФЦ – левофлоксацин
АН – амикацин	МПН – меропенем
АРН – азитромицин	МХА – агар Мюллера-Хинтона
БАД – биологически активные добавки	НОР – норфлоксацин
БРЦ ВКПМ – биоресурсный центр Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов	ПЕН – бензилпенициллин
ВА – ванкомицин	ПЕРСТ – персонифицированная симбионтная терапия
ВЗК – воспалительное заболевание кишечника	РА – ревматоидный артрит
ГЕН – гентамицин	РИФ – рифампицин
ДДМ – диско-диффузионный метод	РС – рассеянный склероз
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт	СД1 – сахарный диабет 1-го типа
ЗФР – фосфатный физиологический раствор	СРБ – С-реактивный белок
ИАМ – индекс адгезии микроорганизмов	СРК – синдром раздраженного кишечника
ИМ – имипенем	ТЕТ – тетрациклин
	УПМ – условно-патогенные микроорганизмы
	ЦАЗ – цефтазидим
	ЦПМ – цефепим
	ЦРО – цефтриаксон

ЦТК – цефотаксим

ЭРИ – эритромицин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Проблема профилактики и коррекции дисбиозов приобретает в последнее время все большее значение для здравоохранения и требует постоянного расширения номенклатуры средств, восстанавливающих нормальную микрофлору организма человека. В клинической практике применяются биопрепараты пробиотики, изготовленные на основе бактерий, представителей нормальной микрофлоры.

Микробиота кишечника играет важную роль в поддержании здоровья и работоспособности человека. Считается, что она оказывает влияние на иммунную систему, метаболизм, психическое состояние и когнитивные функции человека.

В настоящее время лактобактерии широко применяются в клинической практике в составе различных пробиотиков, биологически активных добавок (БАД) к пище и пробиотических продуктов функционального питания. Термин «пробиотик» предложен ещё в 60-х годах XX века, с тех пор он несколько раз менялся, в 2002 году ВОЗ ввёл новое общепринятое определение: пробиотики - «живые микроорганизмы, которые могут благотворно влиять на хозяина при приёме в достаточных дозах» (Hill et al., 2014).

Пробиотики изначально использовали для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), больных с эзофагитом, хроническим гастритом, язвенной болезнью (Червинец и др., 2020), в последующем многочисленные исследования доказали высокую эффективность применения пробиотиков и при других заболеваниях. Показано, что длительное употребление молока, обогащенного *L. fermentum*, улучшает обучение и память у пациентов с болезнью Альцгеймера (Bonfili et al., 2021).

При лечении колоректального рака некоторые штаммы пробиотиков могут быть полезны в качестве адъювантного терапевтического агента, например, мультигенные и мультиштаммовые пробиотики, включая *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus* (Hu et al., 2015; Kahouli et al., 2017). Многие пробиотики играют положительную роль в поддержании здоровья мочеполовой системы и борьбе с раком, диабетом, ожирением, ишемическим инсультом, аллергиями (Ince et al., 2015; Червинец и др., 2022). В последние десятилетия большое количество исследований направлено на изучение применения пробиотиков для лечения заболеваний полости рта и ухода за полостью рта. Пробиотики, содержащие *L. reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus salivarius* и т.д., способствуют улучшению здоровья полости рта, причём все они представляют собой микроорганизмы, выделенные из полости рта (Yoo et al., 2019; Sivamaruthi et al., 2020; Zhang et al., 2022).

Бактерии рода *Lactobacillus* составляют значительную часть популяции защитных микроорганизмов в микробиоте человека. Лактобациллы – грамположительные палочковидные бактерии, анаэробы или факультативные анаэробы. Имеют протеолитическую активность, опосредованную продуцируемыми ими протеазами и пептидазами, синтезируют ферменты, расщепляющие гексозы, дисахариды и полисахариды, производят ДНК-азу и/или РНК-азу и псевдокаталазу и др. Антагонистическая активность бактерий *Lactobacillus* spp. опосредована их способностью создавать кислую среду, синтезом антибиотических соединений, перекиси водорода, лизоцима (Ильин, Кирюхина, 2014).

Одной из важных характеристик *Lactobacillus* spp. является их антимикробная активность в отношении патогенной и условно-патогенной микробиоты человека (Laparra et al., 2009) с помощью различных

механизмов, включая выработку противомикробных веществ, конкуренцию с патогенами за питательные вещества, стимуляцию иммунной системы человека (Collado et al., 2007). Такие пробиотические бактерии играют защитную роль посредством адгезии и колонизации слизистых оболочек, эффективно конкурируя с патогенами за специфические рецепторы (Fontana et al., 2013).

Пробиотики должны соответствовать нормам генетической безопасности, кроме этого, их эффективность определяется и устойчивостью к антибактериальным средствам, адгезивной активностью, отсутствием конкурентных отношений с индигенной микрофлорой. Всё вышеперечисленное может быть достигнуто за счёт персонализированного подбора пробиотических препаратов (Шендеров, 2009). Наиболее высокой степени индивидуализации препаратов можно достичь при использовании аутоштаммов микроорганизмов, выделенных из микробиоценоза самого человека (Ильин, Кирюхина, 2014). Использование аутопробиотиков из микробиоценоза человека может рассматриваться как отдельное направление персонализированной медицины. Такой индивидуальный подход к подбору препаратов позволяет повысить эффективность как профилактики, так и лечения, снизить риск развития нежелательных лекарственных реакций у каждого пациента (Ильин, Кирюхина, 2014).

Выделенные из кишечника конкретного человека аутоштаммы практически полностью приживаются и эффективно помогают здоровью человека. Самым идеальным решением проблемы восстановления микрофлоры и оздоровления человека является использование аутопробиотиков, т.е. своих собственных, персональных пробиотиков.

В связи с этим, **целью настоящего исследования** явилось выделение аутоштаммов лактобактерий из кишечника человека, изучение их биологических свойств для создания пробиотических препаратов.

Задачи исследования:

1. Выделение чистой культуры и идентификация аутоштаммов лактобактерий из кишечника человека методом масс-спектрометрии.
2. Идентификация аутоштаммов лактобактерий молекулярно-гентическим методом.
3. Изучение биологических свойств аутоштаммов *Lactobacillus* spp.
4. Оценка биосовместимости наиболее перспективных аутоштаммов лактобактерий выделенных в ходе исследований.
5. Анализ полученных данных и сбор коллекции наиболее перспективных аутоштаммов для создания пробиотических препаратов.

Научная новизна и теоретическая ценность. В работе выделено и исследовано 182 штамма *Lactobacillus* spp. Выбраны и идентифицированы наиболее эффективные 10 из исследованных аутоштаммов, которые показали высокую адгезию штаммов *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию, высокую кислотообразующую активность, антагонизм штаммов к условно-патогенным микроорганизмов.

Научно-практическая значимость. Полученные аутоштаммы *Lactobacillus* spp. обладают высокой адгезионной способностью, кислотообразующей и антагонистической активностью и могут быть определены как кандидаты для дальнейших исследований и создания эффективных новых пробиотиков. Они могут применяться в качестве вспомогательных препаратов для повышения эффективности лекарственной терапии и контроля заболеваний, вызываемых энтеропатогенными бактериями.

Апробация результатов. Участие во Всероссийской конференции с международным участием «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства», 30 ноября -1 декабря 2022, г. Уфа

Публикации:

1. Хакимова Л.Р., **Потапова С.М.**, Ахметова Л.Р., Гимранова И.А. Изучение биологических свойств аутоштаммов *Lactobacillus* spp. для создания пробиотиков / Клиническая лабораторная диагностика. 2022. (в печати) (РИНЦ, ВАК, Scopus).

2. **Потапова С.М.**, Минлигареева Е.В., Чубукова О.В., Гимранова И.А., Хакимова Л.Р. Исследование биопленкообразования у бактерий *Lactobacillus* spp. И *Bifidobacterium* spp. / Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН. 2022. С. 38-39.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Численность и разнообразие кишечных *Lactobacillus* spp.

Лактобациллы — грамположительные палочковидные бактерии, анаэробы. Они имеют протеолитическую активность, опосредованную продуцируемыми ими протеазами и пептидазами, синтезируют ферменты, ферментирующие гексозы, дисахариды и полисахариды, производят ДНКазу и/или РНКазу и псевдокаталазу и тому подобное. Антагонистическая активность бактерий рода *Lactobacillus* опосредована их способностью создавать кислую среду, а также синтезом антибиотических соединений, перекиси водорода и лизоцима (Borisov, 2002, Ильин, 2014). *Lactobacillus* spp. были выделены из всего ЖКТ человека (от полости рта до фекалий), а также из кожи и влагалища (Almonacid et al., 2017; Chu et al., 2017). По оценкам, данный род составляет 6% от общего числа бактериальных клеток в двенадцатиперстной кишке человека (Nistal et al., 2015) и примерно 0,3% всех бактерий в толстой кишке (Almonacid et al., 2017). Эти уровни аналогичны количеству лактобацилл, обнаруженных у свиней, и составляют от 5 до 0,1% от общего количества бактерий в проксимальном (Fan et al., 2017) и дистальном (Slifierz et al., 2015) кишечнике соответственно. Лактобактерии были обнаружены в большем количестве у макак-резусов (до 30% и 10% всех бактерий в тонком и толстом кишечнике соответственно) (Mohan et al., 2016). Доля *Lactobacillus* spp. в моделях на грызунах колебалась от 30 до 60% числа бактерий в подвздошной кишке и примерно 25% в толстой кишке (Morikawa et al., 2017; Li et al., 2016) (рисунок 1). Лактобациллы также могут доминировать в микробиоте влагалища человека (90–100% от

общего количества присутствующих бактерий) и обнаруживаются на коже, но в гораздо меньшей относительной численности (Chu et al., 2017).

Только несколько из более чем 200 известных видов *Lactobacillus* spp. постоянно и неоднократно ассоциировались с ЖКТ человека. С недавнего времени это число было увеличено до более чем 50 видов *Lactobacillus* spp., которые неоднократно обнаруживались в стуле здоровых людей (Rossi et al., 2016). Наиболее распространенными лактобациллами являются *L. casei*, *L. delbruckeii*, *L. murinus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* и *L. ruminus*. Некоторые из этих видов (например, *L. rhamnosus* и *L. murinus*) редко выделяются из окружающей среды за пределами кишечника и считаются аутохтонными микроорганизмами кишечника. Другие участки слизистой оболочки колонизированы различными видами (например, *L. crispatus* во влагалище) (Gosmann et al., 2017). По-видимому, среди некоторых видов *Lactobacillus* spp. также существует специфичность к хозяину, как это показано для линий *L. reuteri* (Duar et al., 2017).

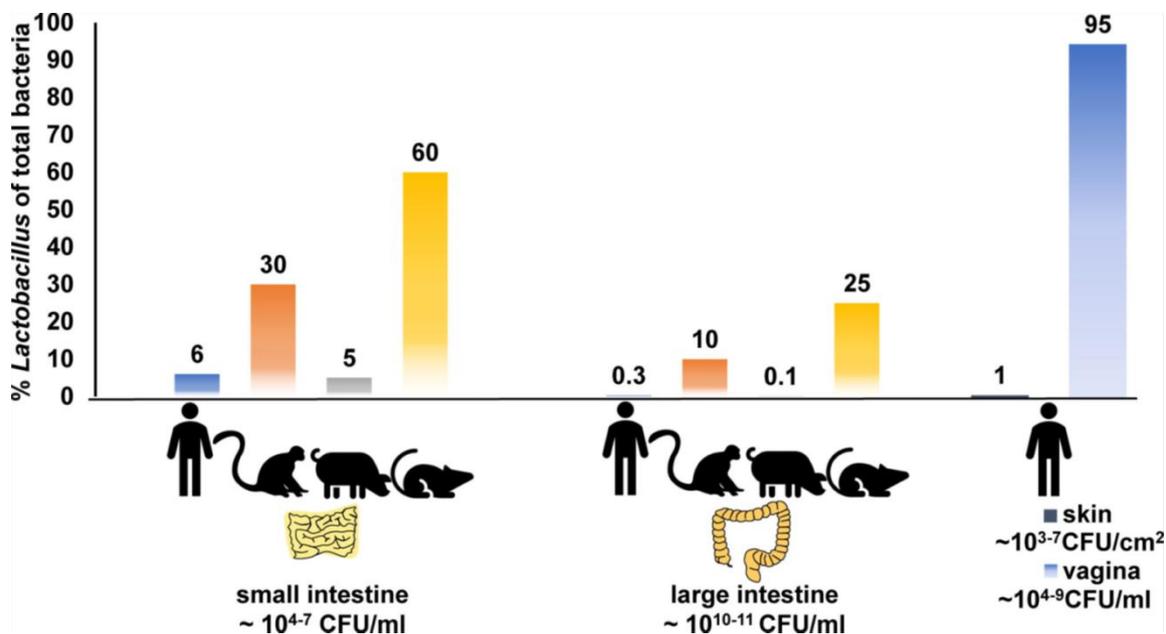


Рисунок 1. Относительная численность *Lactobacillus* spp. у людей и животных (указывано общее количество клеток бактериального сообщества организма) (Heeney et al., 2018)

1.2. Методы идентификации *Lactobacillus* spp.

В микробной экологии подходы, основанные на культивировании, дают неполную картину микробного разнообразия. Экологические ниши представляют собой сложную взаимосвязь между различными видами микробов, которую невозможно воспроизвести с помощью традиционных методов культивирования. Молекулярные подходы, которые обходят этап культивирования, стали популярными как средство определения микробного разнообразия из разных источников. Эти методы предоставили важную информацию о микробных экосистемах, включая источники пробиотиков. Первым важным шагом в изучении экосистемы является изоляция ее членов (Fontana et al., 2013).

Первым шагом в выделении пробиотических бактерий является поддержание образца в адекватных условиях перед инкубацией в селективной среде. Для избирательного или селективного выделения лактобактерий было разработано несколько сред (Beerens, 1990; Dave, Shah, 1995; Silvi et. al., 1996; Hartemink et. al., 1996; Hartemink, Rombouts, 1999). Rogosa с соавт. (1951) разработали селективную среду для выделения и подсчета оральных и фекальных лактобацилл и бифидобактерий, содержащую основу из колумбийского агара с добавлением пропионовой кислоты. Низкий рН этой среды, переносимый лактобациллами и бифидобактериями, подавляет рост других преобладающих организмов в фекалиях человека, таких родов как *Bacteroides* и *Eubacterium*. Изоляты инкубируют при 37°C в течение 48–72 ч в атмосфере, обогащенной CO₂ для

роста лактобацилл. Затем колонии выделяют и переносят в бульон или на новую чашку с агаром.

Идентификация микробов в ЖКТ или пищевых источниках является первым шагом в выборе потенциальных пробиотиков. Для многих экосистем в культуре можно выращивать лишь небольшой процент микробов (Amann et al., 1996). Исторически для идентификации бактерий использовались фенотипические методы. Таксономия на протяжении многих десятилетий в значительной степени зависела от типа ферментации сахара и образующихся продуктов ферментации. В настоящее время предпочтительным методом стал анализ гена 16S рРНК. В течение последних десятилетий микробиологи использовали этот консервативный фрагмент для филогенетической классификации (Winker, Woese, 1991).

Однако фрагмент ДНК 16S чрезвычайно мал (1500 п.н.) по сравнению с бактериальным геномом (30 000–40 000 п.н.). Дополнительная информация обычно необходима из-за недостаточного разнообразия последовательностей оснований для дифференциации штаммов данного вида. Межгенная спейсерная область от 16S до 23S демонстрирует большое разнообразие последовательностей и длин (Leblond-Bourget et al., 1996). Следовательно, анализ только гена 16S рРНК тоже не является 100%-ым методом идентификации *Lactobacillus* spp. до вида. Несомненно, анализ бактериального генома является наиболее полезным инструментом для выявления и характеристики процессов, лежащих в основе видообразования и эволюции прокариот (Feher et al., 2012).

1.3. Биологические свойства аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

При приеме внутрь достаточное количество метаболически активных бактерий должно преодолеть барьер ЖКТ и временно сохраниться в ЖКТ,

чтобы оказать свое благотворное влияние. Эта характеристика важна, не смотря на то, что есть данные о благотворном влиянии неживых пробиотиков (de los Reyes-Gavilán et al., 2012) на организм человека.

Одним из важных характеристик *Lactobacillus* spp. является его антимикробная активность в отношении патогенной и условно-патогенной микробиоты человека с помощью различных механизмов, включая выработку противомикробных веществ, конкуренцию с патогенами за питательные вещества и стимуляцию иммунной системы человека. Такие бактерии играют защитную роль посредством адгезии и колонизации на поверхности слизистых оболочек, эффективно конкурируя с патогенами за специфические рецепторы (Fontana et al., 2013).

1.3.1. Адгезия к эпителиальным клеткам кишечника

Адгезия к эпителиальным клеткам кишечника и/или слизи также является важной характеристикой пробиотиков, способствующая долговременному пребыванию в кишечнике, исключению патогенов и взаимодействию с иммунной системой человека. Клеточная линия Caco-2 широко используется для определения способности к адгезии бактериальных штаммов. Клетки Caco-2 образуют однородный монослой, напоминающий слой зрелых энтероцитов человека в тонкой кишке (Lenaerts et al., 2007). Линия клеток толстой кишки HT-29 также имеет типичные характеристики дифференцировки энтероцитов и используется для анализа адгезии *in vitro* (Gopal et. al., 2001). Лактобациллы, бифидобактерии и патогены демонстрируют различия в адгезии к слизи, Caco-2, Caco-2 плюс слизь, HT-29 MTX и Caco-2/HT29MTX. Для *L. rhamnosus* GG указанные способности к адгезии в этих системах составляют 10.21, 5.17, 3.19, 0.84 и 0,85 % соответственно. В таких исследованиях *in vitro* оценивается адгезия

потенциальных пробиотических бактерий и их взаимодействие с патогенами на поверхности эпителия кишечника, и результаты зависят от используемых методов и штаммов (Izquierdo et al., 2008).

Кишечные инфекции опосредованы адгезией патогенных бактерий к поверхностям слизистых оболочек и нарушением микробиоты кишечника. Пробиотические бактерии могут играть защитную роль посредством адгезии и колонизации поверхностей слизистых оболочек, эффективно конкурируя с патогенами за места связывания и питательные вещества и/или иммунную стимуляцию (Sambuy et al., 2005)

Высокая адгезивная способность штаммов важна для прикрепления к поверхности кишечника и образования биопленок. Адгезия кишечных бактерий к эпителиальным клеткам является важным шагом к заселению поверхности кишечника или возникновению заболевания. Патогенные бактерии связываются с рецепторами эпителиальных клеток кишечника и образуют плотные контакты, размножаются и продуцируют ферменты или токсины, вызывающие заболевание у человека, они также могут образовывать плотную биопленку, что увеличивает их резистентность к терапевтическим препаратам (Jamal et al., 2018). *Lactobacillus* spp. с высокой адгезивной способностью могут ингибировать активность патогенных бактерий, которые колонизируют кишечный тракт, а также могут уменьшать взаимодействие между патогенными бактериями и слизистой оболочкой кишечника, конкурируя за рецепторы для адгезии эпителиальных клеток, и ингибировать образование биопленок патогенными бактериями (Barzegari et al., 2020; Vasiee et al., 2022; Gou et al., 2022). Поэтому исследование адгезивных способностей лактобактерий имеют большую значимость. Например, показано, что пробиотики на основе *Pediococcus pentosaceus* 2–5 и *L. reuteri* L-3 ингибировали рост и адгезию энтеропатогенных бактерий к

клеткам Caco-2, за счет своей высокой адгезивной способности к данным клеткам (26,37% и 21,57% соответственно) (Wang et al., 2022).

1.3.2. Биопленки

Бактерии способны расти, прикрепляясь к разным поверхностям, образуя архитектурно сложные сообщества, называемые биопленками. В биопленках клетки растут в многоклеточных агрегатах, заключенных в внеклеточный матрикс, продуцируемый самими бактериями (Branda et al. 2005; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). Образование биопленок оказывает влияние на организм человека в природных, в медицинских и в промышленных условиях. Например, образование биопленок на медицинских оборудованиях и инструментах, таких как катетеры или имплантаты часто приводит к трудно излечимым хроническим инфекциям (Hall-Stoodley et al., 2004; Donlan, 2008; Hatt and Rather, 2008). Более того, инфекции были связаны с образованием биопленок на поверхностях зубов, кожи и мочевыводящих путей (Hatt and Rather, 2008). Однако, биопленки не всегда вредны для организма человека. К примеру, биопленки зубного налета насчитывают десятки видов, и его состав часто определяет наличие или отсутствие заболеваний. В зубном налете происходит интенсивная колонизация и полезных видов бактерий противодействующих колонизации на поверхности вредных микроорганизмов (Kreth et al., 2008).

Адгезия бактериальных клеток тесно связано с биопленкообразующей способностью штаммов. При исследовании полости рта у здоровых людей и больных пародонтитом, определены их адгезивные свойства и способность к образованию биоплёнок. Выявлено, что микроорганизмы опытной группы обладали большей способностью к адгезии на клетках слизистой оболочки, чем у здоровых людей, при этом усиливалась их способность образовывать

биооплётки проявлять патогенные свойства. Следует отметить, что биооплёткообразование микроорганизмов у здоровых и больных людей отличается (Червинец и др., 2021).

1.3.3. Антимикробная активность

Важным полезным эффектом пробиотиков является антимикробная активность в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий (Laraaga, Sanz, 2009). Пробиотики могут действовать с помощью различных механизмов, включая выработку противомикробных веществ, конкуренцию с патогенами за питательные вещества и участки адгезии и стимуляцию местной иммунной системы человека (Collado et al., 2007).

Способность пробиотических штаммов ингибировать рост патогенов в чашках с агаром при оценке их биологических эффектов и модулировать выработку цитокинов и факторов роста в клеточных линиях была показана *in vitro*. Кроме того, мыши и другие животные модели также подходят для изучения антимикробной активности пробиотиков. Антимикробное действие новых пробиотиков было протестировано в отношении *Listeria monocytogenes* и *Helicobacter pylori in vitro*, а также в отношении ротавируса человека с использованием моделей инфекции *in vivo* (Chenoll et al., 2011; Munoz et al., 2011). Несколько штаммов лактобацилл и бифидобактерий успешно ингибировали рост *Escherichia coli* (Gopal et al., 2001; Chu et al., 2005; Tsai et al., 2008; Candela et al., 2008), *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* (Tien et al., 2006; Jankowska et al., 2008; Cho et al., 2009) и *C. difficile* (Pillai, Nelson, 2008). Более того, штамм *L. plantarum* продуцировал соединения с противогрибковой активностью (Wang et al., 2012).

Примечательно, что в этих исследованиях тестировались отдельные штаммы, и антимикробная активность в большинстве случаев была

обусловлена смешанной иммуномодуляцией хозяина и противоинфекционной активностью пробиотиков.

Хотя в клинических исследованиях использование пробиотиков является многообещающим для лечения диареи, инфекции *H. pylori*, atopических заболеваний, некротизирующего энтероколита (НЭК) и воспалительных заболеваний кишечника, относительное значение пробиотиков остается неясным, а результаты мета-анализы для определения полезных эффектов пробиотиков противоречивы (Naidoo et al., 2011).

1.3.4. Биосовместимость

При изучении биологических свойств *Lactobacillus* spp. немаловажным является исследование межштаммовых взаимодействий бактерий рода *Lactobacillus*, то есть их биосовместимость. Особую значимость это приобретает в свете внедрения в технологические циклы метода совместного культивирования, который является перспективным при создании препаратов и продуктов на основе нескольких штаммов лактобацилл. Имеются данные об успешном совместном культивировании двух видов, где *L. salivarius* и *L. plantarum* имеют близкие физиологические показатели роста и совместное их выращивание имеет соотношение клеток в стационарной фазе 60% к 40% (Головач, 2004). Перспективными в отношении такого технологического подхода можно считать штаммы *Lactobacillus* spp., которые обладают выраженным антагонизмом к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам и средним уровнем антагонизма к другим штаммам этого жерода (Соловьева и др., 2010). Существует несколько подходов к изучению антагонизма микроорганизмов: *in vivo* при использовании гнотобиологической технологии, а также *in vitro*, методами отсроченного антагонизма и совместного культивирования (Попова-

Борзашка и др., 1990; Баженов и др., 1997; Соловьева и др., 2010). Наиболее информативным, а также сложным, дорогостоящим и трудоемким методом определения антагонистической активности является метод *in vivo*. Среди методов выявления антагонизма *in vitro* наибольшее распространение получил метод отсроченного антагонизма на плотной питательной среде, основанный на раздельном, последовательном культивировании испытуемых и индикаторных микроорганизмов. Недостатками метода являются: большой расход питательных сред, длительность и трудоемкость исследования, раздельное последовательное культивирование испытуемого и индикаторного микроорганизмов, в результате чего можно определить только чувствительность индикаторной культуры к продуктам метаболизма испытуемого штамма, выращенного первым. Следовательно, метод отсроченного антагонизма позволяет обнаружить только продуцируемые экзаметаболиты, подавляющие развитие других бактерий, и не выявляет конкурентной борьбы, которая происходит при их совместном культивировании. В этом случае не в полной мере выявляются конкурентные взаимоотношения, которые могли бы проявиться при совместном выращивании (Соловьева и др., 2010).

1.4. Роль *Lactobacillus* spp. при различных заболеваниях

Последние исследования на животных показали более широкую роль *Lactobacillus* spp. в профилактике и лечении инфекционных заболеваний. Метаболиты триптофана (индольные альдегиды), продуцируемые аборигенными штаммами *L. reuteri*, активируют арилуглеводородные рецепторы хозяина (AHR), стимулируя кишечный и вагинальный эпителиальный барьер и антимикробные реакции, необходимые для ограничения размножения УПМ *Candida albicans* (d'Ettoire et al., 2017).

Аутохтонные *Lactobacillus* spp. также могут играть роль в лечении инфекционных заболеваний и восстановлении иммунного гомеостаза.

1.4.1. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)

Люди, инфицированные ВИЧ и макаки-резус, инфицированные вирусом иммунодефицита обезьян (SIV), имеют уменьшенное количество кишечных *Lactobacillus* spp. (Vujkovic-Cvijin et al., 2015; Yang et al., 2016). Истощение лактобактерий у макак-резусов было связано с потерей Т-хелперных клеток 17 (Th17), способствующих развитию кишечного барьера и повышенной микробной транслокацией (Vujkovic-Cvijin et al., 2015). Потенциал *Lactobacillus* spp. предотвращать или устранять повреждение кишечника во время инфекции был продемонстрирован уменьшением воспаления, опосредованного интерлейкином-1 β и улучшением барьерной функции при инокуляции *L. plantarum* непосредственно в петле подвздошной кишки больных макак вскоре после заражения SIV (Hirao et al., 2014). В популяции людей ВИЧ-положительные пациенты, принимающие пробиотическую добавку с несколькими штаммами, показывали более высокое количество клеток памяти Th17 в периферической крови и кишечнике, а гистологическое исследование биоптатов толстой кишки показало усиление барьерной функции кишечника (d'Ettoire et al., 2017).

1.4.2. Синдром раздраженного кишечника (СРК) и воспалительное заболевание кишечника (ВЗК)

Анализ исследований фекальных микробиомов пациентов с СРК и здоровых людей показал, что лактобациллы были в меньшем количестве у пациентов с диареей и с СРК (Liu et al., 2017). В соответствии с этими результатами метаанализ исследований пробиотических вмешательств (43

рандомизированных контролируемых исследования (РКИ)) для лечения СРК пришли к выводу, что многокомпонентные пробиотики уменьшают симптомы (боль в животе, вздутие живота и метеоризм) (Ford et al., 2014). И наоборот, обилие в кишечнике *Lactobacillus* spp. и других родов, включая *Bifidobacterium*, положительно коррелировало у пациентов с болезнью Крона (БК) (Ford et al., 2014; Lewis et al., 2015). В обоих исследованиях обогащение *Lactobacillus* spp. совпадало с истощением *F. prausnitzii*. Участвуют ли *Lactobacillus* spp. в заболевании или они просто приспособлены к выживанию в провоспалительной среде кишечника неизвестно. И наоборот, при язвенном колите (ЯК) потребление пробиотиков *Lactobacillus* spp. было связано с улучшением клинических симптомов пациентов (Ganji-Arjenaki et al., 2017).

1.4.3. Ревматоидный артрит (РА)

Было показано, что в кишечной микробиоте пациентов с тяжелым и ранним началом РА увеличивается доля *L. salivarius*, *L. ruminus* и *L. iners* по сравнению со здоровыми людьми того же возраста (Zhang et al., 2015). Обогащение *Lactobacillus* spp. также наблюдался у мышей с артритом, индуцированным коллагеном (Liu et al., 2016). Эти результаты противоречат другим исследованиям пробиотиков у пациентов с РА. В одном исследовании у пациентов, потреблявших *L. casei*, наблюдалось снижение показателей активности заболевания, более высокое количество сывороточного IL-10 и снижение уровней сывороточного TNF α , IL-6 и IL-12 по сравнению с плацебо (Vaghef-Mehrabany et al., 2014). Другое РКИ пришло к выводу, что пробиотическая добавка смешанного штамма значительно улучшает показатели активности заболевания и снижает уровень сывороточного С-реактивного белка (СРБ) (Zamani et al., 2016). Такие

результаты могут указывать на видовые или штаммоспецифические различия между аутохтонными и аллохтонными *Lactobacillus* spp. в отношении активности заболевания РА.

1.4.4. Диабет 1 типа (СД1) и ожирение

При сахарном диабете 1-го типа (СД1) доля *Lactobacillus* spp. была ниже чем у здоровых, близких родственников и неродственно здоровых людей (Alkanani et al., 2015). Аналогичное снижение *Lactobacillus* spp. наблюдалось у детей с СД1 (de Goffau et al., 2014). Интересно, что у детей, подвергшихся воздействию пробиотика *Lactobacillus* spp. в раннем возрасте, был значительно снижен риск развития островкового аутоиммунитета (Uusitalo et al., 2016). Пока неясно, как *Lactobacillus* spp. может регулировать аутоиммунитет островковых бета-клеток (de Goffau et al., 2014).

Поскольку виды *Lactobacillus* spp., по-видимому, связаны либо с увеличением, либо с потерей веса (Drissi et al., 2016), несопоставимые результаты среди людей с ожирением могут быть связаны с генетическими различиями среди лактобацилл. Различия между штаммами и видами могут привести к изменениям в углеводном обмене и продукции конечных продуктов ферментации, таких как лактоза (Roy et al., 2015). Производство гидролаз желчных солей является еще одной отличительной чертой некоторых видов *Lactobacillus* spp., и эта активность ответственна за значительное изменение активации передачи сигналов фанезоидного х-рецептора (FXR) и метаболизма липидов в печени (Gonzalez et al., 2015; Zhang et al., 2015).

1.4.5. Рассеянный склероз (РС)

Исследования показывают, что относительное количество кишечных *Lactobacillus* spp. было ниже у пациентов с РС по сравнению со здоровыми взрослыми (Chen et al., 2016). Аналогичное истощение кишечных *Lactobacillus* spp. наблюдалось в доклинической модели РС на грызунах (Stanisavljević et al., 2016). С преимуществом *Lactobacillus* spp. при этом аутоиммунном заболевании согласуются результаты недавнего РКИ пациентов с рассеянным склерозом, согласно которым потребление мультивидового пробиотика улучшало состояние пациентов, самооценку, уменьшало чувства тревоги и стресса, а также снижало уровень СРБ в сыворотке по сравнению с плацебо (Kouchaki et al., 2016). Поскольку циркулирующие уровни лигандов АНР ниже у пациентов с РС по сравнению со здоровыми взрослыми (Lim et al., 2017). *Lactobacillus* spp. могут быть полезны для поддержания или восполнения этих соединений. В связи с этим индольные альдегиды, продуцируемые лактобактериями, оказывали сильное противовоспалительное действие на глиальные клетки головного мозга (астроциты), ограничивая воспаление центральной нервной системы в мышинной модели РС человека (Rothhammer et al., 2016).

1.4.6. Когнитивное развитие и поведение

Материнский пренатальный стресс может влиять на микробиом младенца, потенциально нанося ущерб его когнитивному развитию. У младенцев пренатальные концентрации кортизола обратно коррелировали с уровнями кишечных лактобацилл и лактококков, тогда как протеобактерий было больше (Zijlmans et al., 2015). Сопоставимое истощение *Lactobacillus* spp. наблюдалось в моделях пренатального стресса у грызунов (Golubeva et al., 2015). Пренатальные низкие дозы пенициллина (Leclercq et al., 2017) или диета с высоким содержанием жиров (Buffington et al., 2016) также могут

вызывать долговременный дисбактериоз и поведенческие нарушения у мышей. Этот дефицит может быть предотвращен одновременным введением пробиотиков, содержащих *Lactobacillus* spp., самке (Leclercq et al., 2017) или местным *L. reuteri* потомству (Buffington et al., 2016).

1.5. Пробиотики

В настоящее время наблюдается растущий интерес к пробиотикам в связи с их положительным воздействием на здоровье человека (Liong, 2011). По данным FAO ООН и ВОЗ (2011), пробиотики представляют собой «живые микроорганизмы, которые при введении в достаточных количествах приносят пользу здоровью человека». В частности, чаще всего используются штаммы, принадлежащие к родам *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, которые преобладают в микробиоте желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (Guarner, Malagelada, 2003), чаще всего именно данные бактерии входят в многие функциональные продукты питания и пищевые добавки (Gourbeyre et al., 2011; Frick et al., 2007). Чтобы использовать определенные штаммы как пробиотики, они должны иметь определенные характеристики. Чаще всего критериями выбора пробиотиков являются толерантность к условиям ЖКТ (желудочная кислота и желчь), способность прикрепляться к слизистой оболочке ЖКТ и высокий антагонизм к условным патогенам (Ouwehand et al., 2002).

Эффективный пробиотик должен соответствовать следующим критериям:

1. Оказывать положительное влияние на организм человека;
2. Быть непатогенным, нетоксичным и неиметь побочных действий на организм;
3. Быть устойчивым к условиям ЖКТ (*in vitro* и *in vivo*);

4. Присутствовать в продукте в достаточном количестве жизнеспособных клеток, чтобы обеспечить пользу для здоровья;

5. Быть устойчивым к условиям обработки и хранения для сохранения желаемых свойств и иметь точную маркировку (Collado et al., 2010).

Исследования на людях и животных моделях показали потенциальную клиническую эффективность пробиотиков при многих заболеваниях (Yan et al., 2011). Например, пробиотики могут подавлять (Lye et al., 2009), облегчить непереносимость лактозы (Pelletier et al., 2001) и послеоперационных осложнений (Woodard et al., 2009), проявляют противомикробное действие (Karska-Wysocki et al., 2010) и действия против колоректального рака (Rafter et al., 2007; Liong, 2008), уменьшить симптомы раздраженного кишечника (Moayyedi et al., 2018) и предотвратить воспалительное заболевание кишечника (Golowczyc et al., 2007). Однако пробиотические эффекты штаммоспецифичны, поэтому необходимо изучать каждый штамм отдельно (Williams, 2010).

Механизмы, лежащие в основе полезных эффектов пробиотиков, в значительной степени неизвестны, но, вероятно, являются многофакторными. Тем не менее, несколько важных механизмов, лежащих в основе антагонистических эффектов пробиотиков на различные микроорганизмы, включают модификацию микробиоты кишечника, конкурентное прикрепление к слизистой оболочке и эпителию, укрепление эпителиального барьера кишечника и модуляцию иммунной системы для передачи преимущества хозяину (Fontana et al., 2013).

В кишечнике взрослого человека обитает более 500 различных видов бактерий. На самом деле многие пробиотические штаммы, используемые сегодня, были выделены из ЖКТ, например, *L. gasseri* и *L. reuteri* (Ryan et al.,

2008). Кроме того, показано, что *L. fermentum*, выделенный из образцов биопсии слизистой оболочки толстой кишки человека, обладает антимикробной активностью в отношении патогенов, попадающих через пищу (Varma et al., 2010). Распространенным заблуждением является то, что пробиотики всегда должны колонизировать кишечный тракт, чтобы проявить свои эффекты. На самом деле некоторые пробиотики, например, *B. longum* и *Bacteroides thetaiotaomicron*, присутствуют в кишечной микробиоте человека, а другие, например *L. casei* и *B. animalis* — нет (Ohland, Macnaughton, 2010). Большинство пробиотических штаммов, таких как *B. longum* (Srutkova' et al., 2011) и *L. acidophilus* RY2 (Lin et al., 2009), были выделены из образцов фекалий здоровых взрослых и детей, соответственно.

Выделение пробиотиков не ограничивается человеческим ЖКТ. Кишечник некоторых видов животных, в том числе свиней, крыс и даже домашней птицы, являются хорошими источниками пробиотиков (Petrof, 2009). Недавно было показано, что *L. johnsonii* CRL 1647, выделенный из кишечника пчел *Apis mellifera* L., оказывает благотворное влияние на колонии медоносных пчел (Audisio, Benítez-Ahrendts, 2011). Кроме того, пробиотические штаммы были получены из кишечных трактов морских и пресноводных рыб, таких как *Carassius auratusgibelio* (Chu et al., 2011), радужная форель (Pe´rez-Sa´nchez et al., 2011) или креветки (Hil et al., 2009).

Другие исследования показывают, что пробиотические штаммы также обнаруживаются в немолочных ферментированных субстратах (Rivera-Espinoza, Gallardo-Navarro, 2010). Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что некоторые бактериальные штаммы, выделенные из мяса (*L. sakei*, *L. curvatus* и *Staphylococcus carnosus*) и фруктов (*L. paracasei* и *L. plantarum*), могут проявлять функциональные и метаболические свойства, сходные с кишечными бактериями человека (Haller et al., 2010).

Исследования Асеми с соавт. (Asemi et al., 2011) оценили влияние ежедневного потребления пробиотического йогурта на воспалительные факторы у беременных женщин. Субъекты потребляли 200 г пробиотического йогурта, содержащего *L. acidophilus* La5 и *B. animalis* BB12, или 200 г обычного йогурта ежедневно в течение 9 недель. Употребление пробиотического йогурта значительно снижало экспрессию С-реактивного белка, но не влияло на ФНО- α . Кроме того, употребление беременными женщинами пробиотического йогурта приводило к повышению уровня глутатионредуктазы эритроцитов, но не влияло на другие показатели оксидативного стресса (Asemi et al., 2012).

1.6. Биобезопасность и промышленное производство пробиотиков

В 2002 г. для решения важных научных и технических вопросов, касающихся безопасности пищевых продуктов и кормов, было создано Европейское управление по безопасности пищевых продуктов (постановление № 178/2002). Научный комитет по питанию животных предложил «условную презумпцию безопасности» (2007). Оценка безопасности включает четыре этапа: (1) определение таксономии микроорганизма; (2) сбор достаточной информации, обеспечивающей основу для квалифицированного статуса «презумпции безопасности», включая научную литературу, промышленное применение и данные об экологии и вмешательстве человека; (3) исключение патогенности и (4) определение цели использования исследуемого штамма.

При оценке безопасности пробиотиков учитываются различные факторы, а именно:

1. выделения и таксономическая классификация пробиотиков-кандидатов;

2. производственный контроль, исключающий загрязнение (включая перекрестное загрязнение между партиями) пробиотиков с другими микроорганизмами или веществами;

3. оценка связи пробиотиков с инфекционностью или токсичностью на уровне штамма;

4. определение физиологического статуса потребляющего населения, включая новорожденных и тяжелобольных (вводимая доза и способ введения).

Для продажи пробиотиков в качестве пищевых продуктов или пищевых добавок необходимо определить безопасность каждого конкретного штамма для населения в целом (Sanders et al., 2010).

Следующим шагом после выделения, идентификации и характеристики пробиотического штамма и подтверждения его безопасности является масштабное производство. Промышленное производство опирается на два аспекта. Во-первых, микроорганизм необходимо культивировать в подходящей среде, чтобы обеспечить рост в больших количествах. Во-вторых, необходимо обеспечить жизнеспособность пробиотиков во время производства. Оба этих аспекта важны, и несоответствие этим критериям может стать решающим даже для изначально многообещающего штамма *Lactobacillus* spp. Например, некоторые штаммы могут не расти должным образом, не выдерживать процессы сушки или добавление консервантов для поддержания жизнеспособности в течение всего срока годности произведенного продукта (Fontana et al., 2013).

1.7. Аутопробиотики

Альтернативой фекальной трансплантации является подход, основанный на использовании штаммов собственных бактерий человека для

восстановления нормальной микробиоты в случае дисбиотических состояний. Этот подход, названный как технология аутопробиотиков, или персонафицированная симбионтная терапия (ПЕРСТ), предполагает выделение отдельных представителей микробиоты в виде чистых культур, их генетический анализ и возвращение бактерий обратно в кишечник после размножения их вне организма (Fang et al., 2018; Bäumlér, Sperandio et al., 2016). Многообразные исследования на лабораторных животных показали безопасность ПЕРСТ-терапии. Собственные микроорганизмы человека успешно колонизируют кишечник и способствуют восстановлению микробного консорциума. Аутоштаммы, выделенные от конкретного человека, можно проанализировать на присутствие генов патогенности, что даст возможность исключить побочных реакций аутопробиотика. В идеале предполагается выделение аутоштамма из микробиоты, сохраненной в криобанках. Но клинические исследования показали, что возможно выделять аутоштаммы и у пациентов с дисбактериозами (Pamer, 2016). Обычно процедура от забора микробиоты до подготовки аутопробиотика в виде молочнокислой закваски занимает 7 дней.

Исследования на пациентах с онкологическими заболеваниями, метаболическими и нейродегенеративными расстройствами показали возможность успешной микробной терапии при этих заболеваниях (Ермоленко и др., 2017; Соловьева и др., 2017; Suvorov et al., 2018; Симаненков и др., 2020; Боровкова и др., 2020). В настоящее время в рамках исследовательских проектов Научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины» проводится комплекс исследований, посвященных возможности использования аутопробиотиков на основе индигенных энтерококков при метаболическом синдроме и колоректальным раке. Первые результаты данных работ обнадеживают. Однако

восстановление естественного микробиоценоза требуется не только в случае дисбиоза кишечника. Заболевания кожи, гениталий, ротовой полости также протекают с нарушением микробиоценоза, причем в ряде случаев эти нарушения имеют этиологическое значение. Поисковые исследования микробной терапии заболеваний у людей с нарушениями в этих областях микробной колонизации уже сейчас дают самые обнадеживающие результаты (Суворов, 2022).

Несомненно, что в настоящее время нет достаточного количества данных об эффективности и отдаленных последствиях микробной терапии и, в частности, терапии аутопробиотиками. Благодаря современным исследованиям в будущем будут разработаны новые подходы к аутопробиотикотерапии, а штаммовый и видовой состав аутопробиотиков будет существенно расширен. Перспективы коррекции микробиоценоза аутопробиотиками во многом зависят от создания сети криохранилищ для консервации микробиоты здоровых лиц в качестве резерва наиболее клинически эффективных штаммов. Однако уже очевидно, что микробная терапия и микробная модуляция микробного состава людей с различными патологиями, обусловленными или сопровождающимися дисбиозом, являются важнейшими компонентами персонифицированной терапии современности.

Пробиотики изначально использовали для лечения заболеваний ЖКТ, больных с эзофагитом, хроническим гастритом, язвенной болезнью (Червинец и др., 2017, 2020), в последующем, многочисленные исследования доказали высокую эффективность применения пробиотиков и при других заболеваниях. Например, длительное употребление молока, обогащенного *L. fermentum*, улучшает обучение и память у пациентов с болезнью Альцгеймера (Vonfilii et al., 2021). При лечении колоректального рака

некоторые штаммы пробиотиков могут быть полезны в качестве адъювантного терапевтического агента, например, мультигенные и мультиштаммовые пробиотики, включая *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. Acidophilus* (Hu et al., 2015; Kahouli et al., 2017). Также было показано, что многие пробиотики играют положительную роль в поддержании здоровья мочеполовой системы и борьбе с раком, диабетом, ожирением, ишемической инсультом и аллергиями (Waigankar et al., 2011; Sunita et al., 2012; Kang et al., 2013; Takeda et al., 2014; Ince et al., 2015; Allaker, Stephen, 2017; Kahouli et al., 2017). В последние десятилетия большое количество исследований направлено на изучение применения пробиотиков для лечения заболеваний полости рта и ухода за полостью рта. В настоящее время установлено, что пробиотики, состоящие из *L. reuteri*, *L. brevis*, *Streptococcus salivarius* и т. д., способствуют улучшению здоровья полости рта, причем все они представляют собой микроорганизмы, выделенные из ротовой полости (Ohshima et al., 2016; Yoo et al., 2019; Sivamaruthi et al., 2020; Червинец и др., 2021; Zhang et al., 2022). Также есть предположения, что пробиотики могут уменьшать гипервоспаление при COVID-19 благодаря своим противовоспалительным эффектам (Bafeta et al., 2018).

Таким образом, остаются актуальными вопросы поиска новых штаммов-кандидатов бактерий рода *Lactobacillus* для создания новых пробиотических препаратов и продуктов функционального питания.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования и материалы

В качестве биоматериала была взята утренняя порция кала и мазок с буккального эпителия от 264 пациентов, находящихся на лечении у гастроэнтеролога (г.Уфа) с разными проблемами ЖКТ, которые сопровождались дисбактериозом. Среди них: мужчин – 103, женщин – 161.

В результате исследований были выделены 182 штаммов *Lactobacillus* spp., в ходе анализа способности к адгезии к буккальному эпителию, антагонизму к патогенным бактериям и другим характеристикам были отобраны наиболее эффективные и перспективные 10 штаммов-кандидатов для более подробного изучения (таблица 1).

Таблица 1 – Исследуемые штаммы *Lactobacillus* spp.

№ п/п	Вид <i>Lactobacillus</i> spp.	Название штамма
1	<i>L. paracasei</i>	9SM
2	<i>L. plantarum</i>	Dec 1
3	<i>L. fermentum</i>	12 Pet
4	<i>L. fermentum</i>	Ku-f
5	<i>L. delbrueckii</i>	14 Ul-d
6	<i>L. paracasei</i>	15 Sul-c
7	<i>L. fermentum</i>	10 POD
8	<i>L. plantarum</i>	7LV
9	<i>L. paracasei</i>	Куз 2
10	<i>L. fermentum</i>	8 AM

Для определения антибиотикочувствительности использовали диски с разными антибиотиками (НИЦФ, Санкт-Петербург): Ванкомицин (ВА) 30 мкг; Меропенем (МПН) 10 мкг; Амикацин (АН) 30 мкг; Рифампицин (РИФ) 5 мкг; Тетрациклин (ТЕТ) 30 мкг; Норфлоксацин(НОР) 10 мкг; Левофлоксацин (ЛФЦ) 5 мкг; Эритромицин (ЭРИ) 15 мкг; Кларитромицин (КТМ) 15 мкг; Азитромицин (АРН) 15 мкг; Гентамицин (ГЕН) 10 мкг; Цефтриаксон (ЦРО) 30 мкг; Цефтазидим (ЦАЗ) 30 мкг; Цефотаксим (ЦТК) 30 мкг; Цефепим (ЦПМ) 30 мкг; Имипенем (ИМ) 10 мкг; Амоксициллин (АКЦ) 20 мкг; Ампициллин (АМП) 10 мкг; Бензилпенициллин (ПЕН) 10 мкг; Левомецетин (ЛЕВ) 30 мкг.

Бактериальные штаммы выращивали на коммерческой среде Lactobacillus MRS agar (HiMedia, India).

Таблица 2 – Состав стандартных питательных сред

питательная среда МРС-1 (жидкая), г/л:	пептон – 10.0; дрожжевой экстракт – 20.0; глюкоза – 20,0; твин-80 – 1.0; дикалия гидрофосфат – 2.0; натрия ацетат – 5.0; триаммония цитрат – 2.0; магния сульфат – 0.2; марганца сульфат (MnSO ₄ ·4H ₂ O) – 0.05; мясная вода – до 1 л; рН 6.2
питательная среда МРС-2 (полужидкая)	МРС-1 + 0,15 % агара
питательная среда МРС-4 (твердая)	МРС-1 + 2 % агара

2.2. Методы исследования

2.2.1 Методика бактериологического исследования толстого кишечника

Взвешивали 1 г нативного кала (без консерванта), гомогенизировали в 9 мл физиологического раствора (0,85% раствор хлорида натрия) или фосфатного буфера, получая исходное разведение материала (10^{-1}). Содержимое контейнера тщательно перемешивали стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 10–15 мин. Из исходного разведения делают высев на среды, обычно используемые для выделения патогенных энтеробактерий и жидкие среды обогащения для выделения патогенных кишечных палочек. Из исходных готовили ряд последующих разведений материала в физиологическом растворе до 10^{-9} , 10^{-10} . Каждое разведение кала готовили новой стерильной пипеткой. Из приготовленных разведений делали дозированные посеvy на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов. На плотные среды в чашках Петри наносили 0,1 мл взвеси из соответствующих разведений с последующим втиранием материала шпателем. В жидкие, полужидкие и плотные среды, разлитые в пробирки высоким столбиком, вносили 1 мл взвеси на 9 мл. Все посеvy инкубировали при 37 °C 24–48 ч; чашки со средой Сабуро оставляют после этого еще на двое суток при комнатной температуре 18–24 °C. Для культивирования анаэробов использовали анаэроостаты, анаэробные камеры; эксикаторы. Можно использовать разовые коммерческие пакеты и генераторы. Посевы инкубировали не менее двух суток.

2.2.2. Выделение чистой культуры аутоштамма *Lactobacillus* spp.

В ходе проведения бактериологического исследования на дисбактериоз может быть поставлена задача по выделению аутоштаммов индигенной микрофлоры конкретного индивидуума. В этом случае проводится дополнительная работа не предусмотренная протоколом

исследования на дисбактериоз. Аутоштаммы выделяли из фекалий путем последовательных десятикратных разведений физиологическим раствором исследуемого материала до 10^{-8} . Исследуемый материал из различных разведений засеивали на соответствующие питательные среды для выделения лактобактерий (MRS 1). Через двое суток материал из изолированных колоний лактобактерий, выросших на среде MRS-1, вновь пересеивали на соответствующие селективные питательные среды.

Выросшие через 2 суток после второго пассажа изолированные колонии лактобактерий пересеивали на жидкие среды MRS-2 для получения биомассы микроорганизмов, которая будет использована в виде аутоштаммов для лечения дисбактериоза кишечника.

В данном способе в виде аутоштаммов будет использовано всего по одному доминирующему штамму лактобацилл из всего многообразия видов этих индигенных микроорганизмов (до 5 видов лактобацилл). Кроме того, при данном способе выделения аутоштаммов велика вероятность того, что выделенные культуры являются клонами чужеродных для хозяина микроорганизмов, случайно попавших в пищеварительный тракт с пищей и водой.

Для того, чтобы получить возможность выделения наибольшего количества индигенных видов *Lactobacillus* spp. из кишечника индивида, а также исключить попадания транзиторных штаммов лактобактерий была необходимость в расширенных исследованиях биологического материала в ходе проведения исследований на дисбактериоз.

В дополнении к известной методике были проведены дополнительные меры по обеспечению выделения именно аутоштаммов лактобактерий конкретного индивидуума, а также обеспечить возможность выделения

отдельных клонов (видов лакто бактерий с целью их дальнейшей идентификации).

Для этого мы использовали дополнительные методики: производили высев лактобактерий на селективные среды жидкие и твердые в 3-х повторностях с расширением титров высева от -3 разведения до -5 - 6 - 7, до получения отдельных колоний данных родов бактерий на агаризованной селективной среде

При выделении лактобактерий из жидких селективных питательных сред невозможно выделить чистые культуры бактерий одного вида. Поэтому дополнительно производили высев на агаризованные питательные среды в различных разведениях от -3 до - 5 , - 6, - 7 с целью получения отдельных колоний бактерий, каждая из которых принадлежит определенному виду.

Из отдельно выросших колоний лактобактерий - производили выделение отдельных клонов с последующим анализом каждого из выделенных клонов на видовую принадлежность: морфологические характеристики, исследования с помощью масс- спектрометрии для определения вида, а также свойство физиологической активности - способности сбразивать молоко (кислотообразующая активность), антагонистическую активность, адгезивную способность, антибиотикочувствительность, эмульгирующую способность и способность к образованию биопленок.

Выбранные клоны лактобактерий рассевали на питательные среды с пассированием (от 2 до 4 пассажей) на средах с возрастающим объемом (от 5 мл до 1 л). Выращивание аутоштаммов лактобактерий на питательной среде MRS проводили в течение (40 ± 4) часов при (37 ± 2) °C в условиях термостата. По окончании процесса выращивания биомассу аутопробиотика лактобактерий разливали по 10,0 мл или по 100 мл в стерильные флаконы.

Флаконы маркировали и производили отбор 3 флаконов на контроль полученного препарата.

Таким образом, в результате осуществления данной технологии получили аутопробиотик определенного вида с морфологически и физиологическими характеристиками и в необходимом объеме.

2.2.3. Контроль полученного аутоштамма лактобактерий

Контроль полученного аутоштамма осуществляли общепринятыми методами:

- 1) контроль морфологических и тинкториальных свойств культуры;
- 2) контроль на наличие контаминации посторонними бактериями осуществляли путем посева на селективные питательные среды: Эндо, Плоскирева, МПА, Сабуро для определения посторонней микрофлоры;
- 3) контроль количественного содержания бактерий аутоштаммов в биомассе аутопробиотика (КОЕ);

- определение содержания КОЕ лактобактерий проводили на агаризованной среде МРС-1 в 10^{-6} , 10^{-7} разведениях и выражают в КОЕ/ мл препарата).

Лактобактерии - факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа, азота, а также в присутствии кислорода; каталазу не продуцируют, образуют молочную кислоту.

2.2.4. Определение титра КОЕ лактобацилл

Определение титра живых бактерий (титр КОЕ) в 1 мл исследуемой жидкости проводили согласно Общей фармакопейной статье ОФС 42 - определение специфической активности пробиотиков. Для лактобактерий использовали коммерческую среду МРС-1, МРС-2 или МРС-4. Испытания

проводили, соблюдая правила асептики. Из полученной микробной суспензии испытуемого образца аутоштамма лактобактерий готовили ряд последовательных десятикратных разведений в пробирках, содержащих по 9 мл 0,9 % раствор натрия хлорида. Для этого исходную суспензию лактобактерий 10-15 раз перемешивают пипеткой и 1 мл бактериальной суспензии переносили в пробирку, содержащую 9 мл 0,9 % раствор натрия хлорида, получая следующее разведение (10^{-1}). Новой пипеткой содержимое пробирки перемешивали 8-10 раз и 1 мл суспензии переносили в следующее разведение. Титрование проводили до разведений, из которых будет произведен высеv на питательные среды. Для каждого разведения использовали отдельную пипетку.

2.2.5. Посев на плотные питательные среды (метод Коха) для лактобактерий микроаэрофилов

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца из двух последних разведений (степень разведения зависит от количества КОЕ в дозе исследуемого препарата) по 0,1 мл микробной суспензии высевали на чашки Петри с питательной средой (по две чашки на каждое разведение). Суспензию равномерно распределяли по поверхности среды шпателем Дригальского или с помощью стеклянных бус, до полного впитывания (высыхания) суспензии, чашки закрывали и помещали перевернутыми вверх дном в термостат для инкубации.

Посевы инкубировали при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 24-96 ч в адекватных, в зависимости от вида микроорганизма, условиях (аэробных, микроаэрофильных или анаэробных). При инкубировании в анаэробных или микроаэрофильных условиях чашки Петри с посевами помещали в

анаэроостат и создавали необходимые условия среды (анаэробные, микроаэрофильные).

Данный метод может быть использован при определении количества живых бактерий каждого вида в поликомпонентных пробиотиках при наличии визуальных отличий по форме колоний бактерий.

Учет результатов:

По окончании инкубации производили подсчет выросших на чашках Петри колоний и вычисляли содержание живых бактерий в одной дозе испытуемого образца. При подсчете учитывали чашки, на которых выросло не менее 15 колоний.

Пример расчета содержания живых микробных клеток в одной дозе испытуемого образца:

- из разведения 10^{-7} выросло 42 и 45 колоний; среднее арифметическое равно $(42+45) : 2 = 43,5$;

- из разведения 10^{-6} выросло 410 и 450 колоний; среднее арифметическое равно $(410+450) : 2 = 430$;

- количество живых бактерий в одной дозе равно КОЕ= $4,3 \times 10^9$:кл/мл.

2.2.6. Идентификация выделенных клонов аутоштаммов лактобактерий

2.2.6.1. MALDI-TOF масс-спектрометрия

Идентификацию проводили после морфологического подтверждения клонов аутоштаммов лактобактерий с применением масс-спектрометрии по микробным маркерам из числа высших жирных кислот. У каждого микроорганизма есть «свои», т.е. характерные только ему маркеры, при обнаружении которых делаются заключения о принадлежности бактерий к определенному роду и виду.

VITEK® MS – автоматическая система идентификации микроорганизмов, которая использует технологию MALDI-TOF (времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация). За считанные минуты этот метод масс-спектрометрии проводит идентификацию до вида, рода и семейства.

Этап 1: Подготовка образцов.

Анализ начинался с того, что на подложке масс-спектрометра смешивали биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу.

Этап 2: Идентификация.

Далее образец помещали в прибор и подвергали воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и анализа (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов.

Таким образом, на идентификацию одного микроорганизма потребовалось меньше 2-х минут времени, при этом образцом может служить первичная колония. База данных VITEK® MS состоит из клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов / дерматофитов, микобактерий) и покрывает большинство видов, встречающихся в ежедневной практике микробиологической лаборатории.

Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии позволяет не только идентифицировать микроорганизм, но и в ряде случаев получать уникальный набор рибосомальных белков (фингерпринт) для каждого из исследуемых штаммов, что открывает широкие возможности и перспективы для изучения штаммовых характеристик.

2.2.6.2. Идентификация штаммов до вида методом ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)

В ходе исследования физиологических свойств аутоштаммов были отобраны наиболее эффективные и перспективные 10 аутоштаммов лактобактерий. Для подтверждения видовой принадлежности полученные аутоштаммы секвенировали по гену 16S рРНК с помощью праймеров: 8f – agagtttgatcctggctcag - и 926r - ccgtcaattcctttragttt -.

Режим реакции:

1. 95°C -3мин.
2. 35 циклов:
95°C -30 сек.
57°C -30 сек.
72°C- 1 мин. 30 сек.
3. 72°C - 5мин

Секвенирование проводилось на автоматическом секвенаторе AE3000.

Для анализа секвенсов использовали специализированные филогенетические компьютерные программы. Проводилось не менее трех повторов ПЦР-реакций.

Секвенирование провели в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)

(Москва), все штаммы депонированы там же (паспорта штаммов в приложении 1).

Для точного определения таксономической принадлежности исследуемых штаммов был использован метод идентификации с применением видоспецифических праймеров:

- LU-5 и Rhal1, специфичных для вида *Lactobacillus rhamnosus*;
- LU-5 и Lpar-4, специфичных для вида *Lactobacillus paracasei* (БРЦ ВКПМ, Москва).

2.2.7. Адгезия *Lactobacillus spp.* к буккальному эпителию

Свойство индивидуальной специфичности аутоштаммов лактобактерий определяется их способностью к адгезии или «колонизации» эпителия конкретного индивида, от которого аутоштаммы были получены. Физиологическая активность штаммов определялась их адгезивными свойствами к слизи, гликопротеинам, эритроцитам крови и эпителиальным клеткам желудочно-кишечного тракта человека.

Для изучения индивидуальной адгезии использовали методику изучения адгезивной активности микроорганизмов по Бойцову А.Г и др. (2004) в нашей модификации на модели эпителиоцитов щеки.

При исследовании адгезии бактериальных культур использовали суточные культуры аутоштаммов лактобактерий. Суточную культуру, выращенную на скошенной адекватной питательной среде, смывали забуференным фосфатным физиологическим раствором (ЗФР) и затем дважды отмывали ЗФР с рН 7,2 центрифугированием (1500 об./мин. – 10 мин.). Далее готовили бактериальную суспензию, содержащую $(2 \times 10)^9$ КОЕ/мл.

Методика определения адгезивности бактерий к буккальному эпителию

1. Соскоб буккального эпителия забирали с помощью стерильного деревянного шпателя с внутренней поверхности щеки человека.
2. Соскобы помещали в цитрат-фосфатный буфер и доставляли в лабораторию в течение 2-3 часов.
3. Непосредственно перед началом исследования эпителиальные клетки отмывали путем трехкратного центрифугирования (1000 об/мин - 5 минут).
4. После отмывки из осадка готовили контрольные мазки. Для этого на поверхность предметного стекла наносили 1 каплю осадка и распределяли в диск диаметром около 1,5 см. Мазки фиксировали и окрашивали водным раствором метиленового синего. Образец считали пригодным для дальнейшего исследования, если при микроскопии (увеличение $\times 900$) в каждом поле зрения обнаруживали не менее 2-3 эпителиальных клеток.
5. Для изучения адгезивной активности в пробирку эппендорфа вносили 800 мкл суспензии эпителиальных клеток и 600 мкл суспензии лактобактерий. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C с периодическим повторным перемешиванием путем переворачивания пробирок.
6. После инкубации неадсорбированные бактериальные клетки удаляли двукратным отмыванием путем центрифугирования (1000 об/мин в течение 3 минут).
7. Из осадка готовили мазки, которые после фиксации окрашивали генцианвиолетом. При микроскопии препарата подсчитывали количество бактериальных клеток, прикрепившихся к поверхности каждой

эпителиальной клетки. Результат выражали в виде среднеарифметического числа лактобактерий на поверхности одного эпителиоцита.

8. Подсчет проводили не менее чем у 5 клеток эпителиоцитов и определяли индекс адгезивности по среднему числу адгезировавшихся микроорганизмов. Присваивали балльную оценку: 1 балл - до 30 адгезированных микроорганизмов на одной клетке, 2 балла - 31-60, 3 балла - 61-90, 4 балла - 91-120, 5 баллов - 121 и более, и при количестве адгезированных микроорганизмов в 1-2 балла определяют низкую степень адгезии, в 3 балла - среднюю степень, 4-5 – высокую.

Микроорганизмы считали неадгезивными при ИАМ $\leq 10,5$; низкоадгезивными – от 10,51 до 20,5; высокоадгезивными при ИАМ ≥ 40 и больше.

2.2.8. Определение кислотообразующей активности аутолактобактерий

Методику тестирования кислотообразующей активности (МУК 4.2.2602-10, п.4.7, п.4.8.1; ГОСТ 3624-92) проводили согласно общепризнанным методам.

Культуры аутоштаммов лактобактерий высевали на адекватную плотную питательную среду. Через 2 суток роста получали 1 млрд. взвеси изучаемых культур лактобацилл путем смыва 0,9% раствором натрия хлорида двухсуточных культур этих микроорганизмов, выращенных на соответствующе плотных питательных средах (МРС-1). В две пробирки по ГОСТ 13932-79Е (d - 2 см, h - 20 см) стерильно разливали по 25,0 мл среды и вносили по 2,5 мл полученных взвесей соответствующих пробиотических культур.

Содержимое тщательно перемешивали и выдерживали в течение (44 ± 4) ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. После инкубации проводили определение

кислотности в каждой пробирке. Каждую пробу из указанных пробирок (по 10,0 мл) титровали раствором гидроксида натрия в концентрации 0,1 моль/л (по ГОСТ 4323-77) в присутствии индикатора фенолфталеина (по ГОСТ 5850-72) следующим образом: добавляли по 2-3 капли индикатора до появления стойкого слабо-розового окрашивания, а затем по каплям добавляли гидрооксид натрия. Активность кислотообразования определяли в градусах Тернера (Т°) по ГОСТ 3624-67 и вычисляли по формуле:

$$T = a * k * 10, \text{ где}$$

«а» - количество миллилитров раствора гидроксида натрия в концентрации 0,1 моль/л, пошедшее на титрование;

«к» - 1,03 - поправка к титру раствора гидроксида натрия в концентрации 0,1 моль/л;

«Т» - условная величина, выраженная в мл щелочи, пошедшей на титрование 10 мл исследуемой суспензии.

Учет результатов проводили согласно полученным данным кислотообразование:

99,9 (°Т) и менее - активность низкая;

100,0-149,9 (°Т) - средняя;

150,0 (°Т) и более - высокая.

2.2.9. Антагонистическая активность аутолактобактерий

Антагонистическую активность лактобактерий определяли диффузионным методом (метод перпендикулярных штрихов, метод блоков или метод лунок) основанных на диффузии антибиотических веществ, образуемых испытываемыми штаммами лактобактерий, в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру и подавляющей рост последней.

2.2.9.1. Метод перпендикулярных штрихов

Согласно методу перпендикулярных штрихов, на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевали штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма лактобактерий и инкубировали при оптимальной для него температуре (30°C и 37 °C соответственно для мезофильных и термофильных форм) в течение определенного времени (например, 24 или 48 ч) для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений.

Согласно методу на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевали штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма лактобактерий и инкубировали при оптимальной для него температуре в течение определенного времени (24 ч) для образования и диффузии в агар ингибирующих соединений.

Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры лактобактерий подсевали штрихом экспоненциальную культуру тест-штамма (*E. coli* и *S. aureus*), не касаясь в зоне 1 мм штриха лактобактерии. Чашку вновь инкубировали, но теперь при условиях (температура и продолжительность), благоприятных для роста тест-культуры. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой лактобактерии судят по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста лактобактерии.

В соответствии с ОФС.1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков» зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 20 мм — для штаммов-продуцентов, входящих в лактосодержащие пробиотики;

зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 15 мм — для штаммов-продуцентов, входящих в коли-, бифидосодержащие пробиотики; зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 10 мм — для штаммов-продуцентов, входящих в спорообразующие пробиотики.

2.2.9.2. Метод блоков для определения антагонистической активности аутолактобактерий

При использовании метода блоков испытываемую культуру лактобактерий высевали глубинным способом впитательный агар в чашке Петри и инкубировали в оптимальных, строго соблюдаемых, условиях для образования и накопления в агаре ингибиторных соединений. Затем стерильным пробочным сверлом вырезали агаровый диск (блок) с выросшей культурой лактобактерии и устанавливали его в другой чашке Петри на поверхности агаровой среды, только что засеянной культурой тест-штамма. Чашку выдерживали в течение определенного времени в холодильнике (во избежание преждевременного роста тест-штамма) для диффузии ингибиторных соединений из блока в толщу агара с тест-штаммом, а затем инкубировали в определенных условиях, оптимальных для тест-штамма. О степени антагонистической активности испытываемой лактобактерии судили по величине зоны ингибирования роста тест-штамма вокруг агарового блока

Для тест-штамма в чашке Петри целесообразно формировать двухслойный агар: на дно чашки наливают 15 см³ незасеянной расплавленной плотной (2 % агара) питательной среды (нижний слой), после застывания которой на поверхность наслаивают 5 см³ полужидкой (0,35 % агара) среды, содержащей тест-культуру (верхний слой); это обеспечивает более равномерное распределение тест-штамма по всей поверхности чашки. В отличие от метода перпендикулярных штрихов, метод блоков дает

возможность сравнить на одной чашке несколько (4-8) штаммов лактобактерий к данной тест-культуре.

Преимуществом метода блоков является то, что он позволяет использовать разные по составу питательные среды: одну (блок) - для испытуемой лактобактерии, другую - для использования данного тест-штамма. Кроме того, он удобен для изучения влияния состава питательной среды на продукцию ингибиторных соединений исследуемым штаммом лактобактерий.

2.2.10. Определение чувствительности *Lactobacillus* spp. к антибактериальным препаратам (АБП)

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК (минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде). В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод (ДДМ) позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

Для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам использовали агар Мюллера-Хинтон (МХА).

Для ДДМ использовали чашки Петри диаметром 90 мм, содержащие не менее 20–25 мл питательной среды. Диски с антибиотиками наносили с помощью стерильного пинцета через 10–15 минут после посева. Расстояние от диска до края чашки и между дисками составляло 15–20 мм. Чтобы диски равномерно контактировали с поверхностью питательной среды, аккуратно прижимали их пинцетом. Сразу после этого чашки помещали в инкубатор при 37°C. Оценку результатов проводили через 18–24 часов инкубации.

2.2.11. Определение биосовместимости выделенных аутоштаммов

Lactobacillus spp.

Была проведена оценка биосовместимости выделенных культур по отношению друг к другу. Биологическую совместимость определяли диффузионными методами на плотных питательных средах. Для установления биосовместимости выделенных чистых культур микроорганизмов определяли их антагонистические отношения друг к другу. Использовали 2-х суточные культуры бактерий, выращенные в жидких питательных средах.

Чистую культуру исследуемых штаммов засеивали методом «штриха» по диаметру чашки с МРС агаром. Перпендикулярно от края чашки штрихами засеивали тест-культуры (различные аутоштаммы). Инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Результат учитывали визуально по наличию признаков подавления роста культур. После инкубации визуально учитывали наличие и степень антагонистического действия по размеру зон задержки роста. По полученным данным можно судить о возможности формирования консорциума пробиотического препарата с использованием выделенных штаммов микроорганизмов.

Биосовместимость чистых штаммов микроорганизмов оценивали по интенсивности роста культуры по штриху: «-» – отсутствие роста или образование зоны задержки роста, «+» – слабый рост (отмечен небольшой рост в начале штриха), «++» – средний рост (наличие единичных колоний по всему штриху), «+++» – хороший рост (сплошной рост по всему штриху).

2.2.12. Анализ биопленок, формируемых на инертных поверхностях

Формирование биопленок смотрели в лунках полистиролового 48-луночного планшета («SARSTEDT»). Суспензии суточных культур *Lactobacillus* spp. выращенные на MPC-1 доводили до титра 10^7 КОЕ/мл. В лунки планшета вносили по 300 мкл полученной бактериальной суспензии. Часть лунок использовали в качестве контроля, куда добавляли 300 мкл стерильной среды MPC-1. Планшет накрывали крышкой, заворачивали плёнкой Parafilm («Amcor», США) и инкубировали 3 сут, 1 нед и 2 нед при 37°C. После инкубации для количественного определения интенсивности образования биопленок использовали метод окрашивания генцианом фиолетовым (кристаллическим фиолетовым) («Агат-Мед», Россия) (Вершинина и др., 2021; Чубукова и др., 2022). После удаления содержимого и промывки всех лунок, адгезированные бактерии фиксировались и окрашивались. Избыток красителя отмывали водопроводной водой. Краситель, связанный с адгезированными клетками, элюировали этанолом. Результаты учитывали спектрофотометрически с использованием прибора EnspireModel 2300 MultilabelMicroplateReader («PerkinElmer», США).

2.2.13. Определение эмульгирующих свойств выделенных аутоштаммов

Активность эмульгирования штаммов *Lactobacillus* измеряли по методике Розенберга, а также методом Голденберга и Купера (Rosenberg,

2006; Cooper, Goldenberg, 1987). В мерные пробирки с притертыми пробками объемом 25 мл вносили 5 мл гексадекана и 5 мл культуральной жидкости исследуемого аутоштамма. Содержимое пробирок перемешали на вортексе на максимальной скорости в течение 2 мин. Спустя 24 ч после проведения эксперимента по формуле рассчитывали индекс эмульгирования как отношение объёма плотной эмульсии, которая образуется при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объёму раствора, умноженному на 100%:

$$E_{24} = V_{\text{э}} / V * 100\%, \text{ где}$$

E_{24} – индекс эмульгирования, %;

$V_{\text{э}}$ – объём плотной эмульсии, мл;

V – общий объём раствора, мл.

2.2.14. Статистический анализ

На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из n -числа повторностей (где $n \geq 10$) и их стандартные отклонения. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента, значения t -критерия находили для 95% уровня значимости.

Данные в таблицах и на диаграммах представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно.

Результаты обработаны с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2010.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Выделение и идентификация аутоштаммов *Lactobacillus* spp. по культурально-морфологическим признакам культур

Для выделения аутоштаммов бактерий *Lactobacillus* spp. и доведения их до чистых культур производился пассаж колоний лактобактерий через агаризованную и жидкую МРС – среду с 2 дневным интервалом для роста культуры при 37⁰С. Отдельные колонии, выросшие на агаризованной MRS среде, помещали в жидкую среду и вновь рассевали на агаризованной среде до получения однородной популяции колоний лактобактерий, подтвержденных микроскопическим анализом морфологии клеток (рисунок 2).

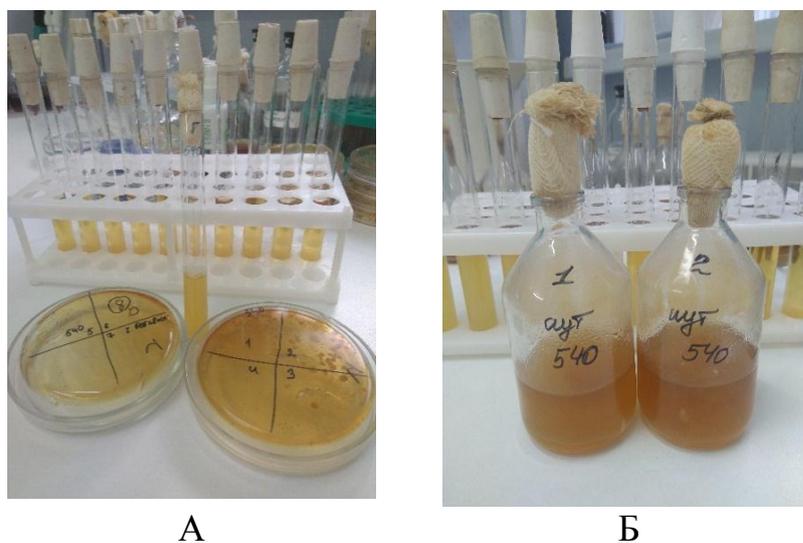


Рисунок 2 – Рост на твердых и жидких питательных средах: А – смешанная культура молочнокислых бактерий на твердой питательной среде MRS; Б – биомасса лактобактерий в жидкой среде

При выделении лактобактерий из жидких селективных питательных сред на первом этапе невозможно выделить чистые культуры бактерий одного вида. Для получения чистой культуры аутоштаммов лактобактерий конкретного индивидуума, с целью выделения отдельных клонов (видов) для их дальнейшей идентификации использовались дополнительные методы: производили высев лактобактерий на селективные среды жидкие и твердые в 3-х повторностях с расширением титров посева от -3 разведения до -5 - 6 - 7, до получения отдельных колоний бактерий, каждая из которых может принадлежать к определенному виду (рисунок 3).

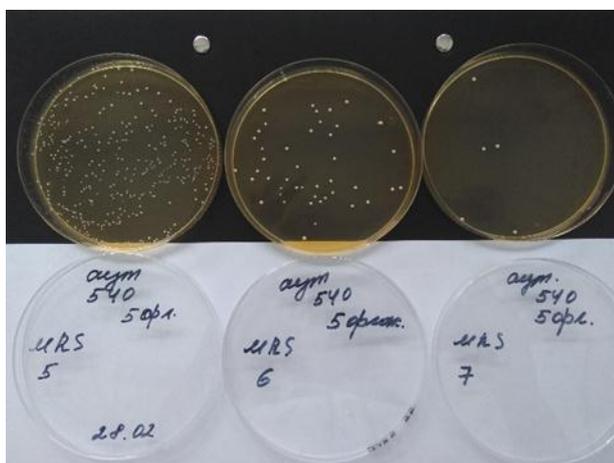


Рисунок 3 – Аутолактобактерии на твердой питательной среде MRS

Из отдельно выросших колоний лактобактерий на агаризованной питательной среде производился посев в жидкую питательную среду, затем вновь посев на агаризованную среду для роста и выделения отдельных клонов с последующим анализом каждого из выделенных клонов на видовую принадлежность. Изучались морфологические характеристики, исследования с помощью масс-спектрометрии для определения вида, а также свойство физиологической активности - способности сбраживать молоко (кислотообразующая активность), антагонистическую активность,

адгезивную способность, антибиотикочувствительность, эмульгирующую способность и способность к образованию биопленок.

3.2. Контроль выделенных аутоштаммов лактобактерий

После получения чистой культуры *Lactobacillus* spp. производился его контроль:

- контроль морфологических и тинкториальных свойств культуры (рисунок 4, 5, 6);

- контроль на наличие контаминации посторонними бактериями (посев на селективные питательные среды: Эндо, Плоскирева, МПА, Сабуро для определения посторонней микрофлоры);

- контроль количественного содержания бактерий аутоштаммов в биомассе аутопробиотика (КОЕ);

- определение содержания КОЕ лактобактерий проводили на агаризованной среде МРС-1 в 10^{-6} , 10^{-7} разведениях и выражают в КОЕ/ мл препарата).

Идентификация видов лактобактерий по культурально морфологическим свойствам позволило выявить их различия (таблица 3).

На плотной среде МРС-4 штаммы *L. plantarum* образовывали выпуклые, непрозрачные, белые колонии; штаммы *L. fermentum* - слабо выпуклые, полупрозрачные, сероватые колонии. Оптимальная температура роста $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$.

Таблица 3 – Культурально-морфологические свойства, выделенных аутоштаммов лактобактерий

Вид	Микроскопия колоний	Рост на твердой питательной среде	Рост в жидкой среде
<i>L. paracasei</i> 9SM	прямые палочки, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии	образуют изолированные колонии в виде тяжей
<i>L. plantarum</i> Dec 1	прямые палочки, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии	образуют изолированные колонии в виде тяжей
<i>L. fermentum</i> 12 Pet	прямые палочки, полиморфные, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки, беспорядочные скопления	образуют слабо выпуклые, полупрозрачные, серовато-белого цвета колонии с сухой поверхностью	образуют изолированные колонии в виде тяжей
<i>L. fermentum</i> Ku-f	прямые палочки, полиморфные, расположенные одиночно, парами,	образуют слабо выпуклые, полупрозрачные, серовато-белого	образуют изолированные колонии в виде тяжей

	могут образовывать цепочки, беспорядочные скопления	цвета колонии с сухой поверхностью	
<i>L. delbrueckii</i> 14 UI-d	прямые палочки, удлинённые, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	образуют непрозрачные сероватые колонии	образуют изолированные колонии в виде тяжёлых
<i>L. paracasei</i> 15 Sul-c	прямые палочки, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии	образуют изолированные колонии в виде тяжёлых
<i>L. fermentum</i> 10 POD	прямые палочки, полиморфные, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки, беспорядочные скопления	образуют слабо выпуклые, полупрозрачные, серовато-белого цвета колонии с сухой поверхностью	образуют изолированные колонии в виде тяжёлых
<i>L. plantarum</i>	прямые палочки,	образуют выпуклые,	образуют

7LV	расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	непрозрачные, белые колонии	изолированные колонии в виде тяжей
<i>L. paracasei</i> Куз 2	прямые палочки, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии	образуют изолированные колонии в виде тяжей
<i>L. fermentum</i> 8 AM	прямые палочки, полиморфные, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки, беспорядочные скопления	образуют слабо выпуклые, полупрозрачные, серовато-белого цвета колонии с сухой поверхностью	образуют изолированные колонии в виде тяжей

Можно отметить, что в пределах вида все штаммы имели схожие культурально-морфологические признаки.

В мазках, окрашенных по Граму, обнаруживались грамположительные палочки длиной от 0,7 до 3,0 мкм, располагающиеся беспорядочными скоплениями или отдельными короткими цепочками, без капсул и спор. При оценке биохимических свойств штаммы *L. plantarum* разлагали без газа глюкозу, целлобиозу, эскулин, фруктозу, галактозу, лактозу, мальтозу,

маннит, маннозу, меллибиозу, салицин, сорбит, сахарозу, трегалозу; не разлагали рамнозу. Штаммы *L. fermentum* ферментировали глюкозу с образованием газа, фруктозу, галактозу, лактозу, мальтозу, маннозу, меллибиозу, сахарозу; не разлагали эскулин, маннит, мелецитозу, рамнозу, салицин, сорбит.

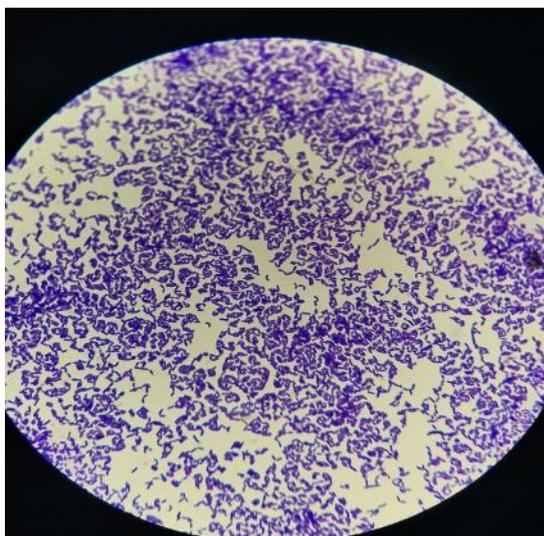


Рисунок 4 – Лактобактерии под световым микроскопом, окраска по Граму (увеличение 15x90)

Лактобактерии на жидкой среде МРС-1 выросли в виде равномерной мути и гомогенного белого осадка на дне пробирки, на полужидкой среде МРС-2 образовывали изолированные колонии в виде тяжей (рисунок 6).

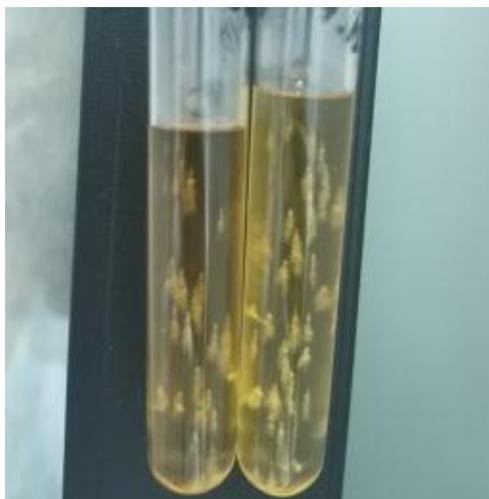


Рисунок 5 – Рост *L. plantarum* в полужидкой питательной среде

В ходе работы были выделены *Lactobacillus* spp. в разных концентрациях от $1,1 \cdot 10^6$ до $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

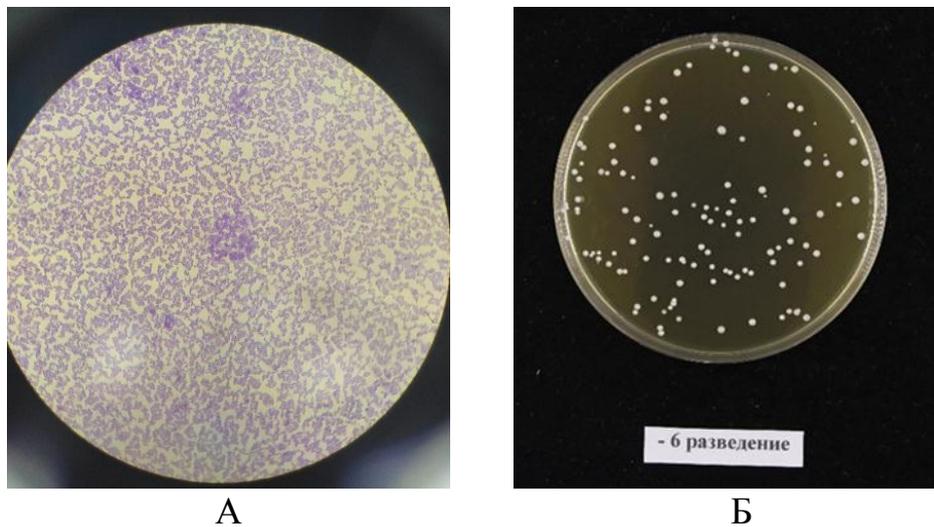


Рисунок 6 – Исследование морфологических и культуральных свойств штаммов *Lactobacillus* spp.: А - под микроскопом Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Germany); Б – рост колоний *Lactobacillus* spp. на MPC-агаре.

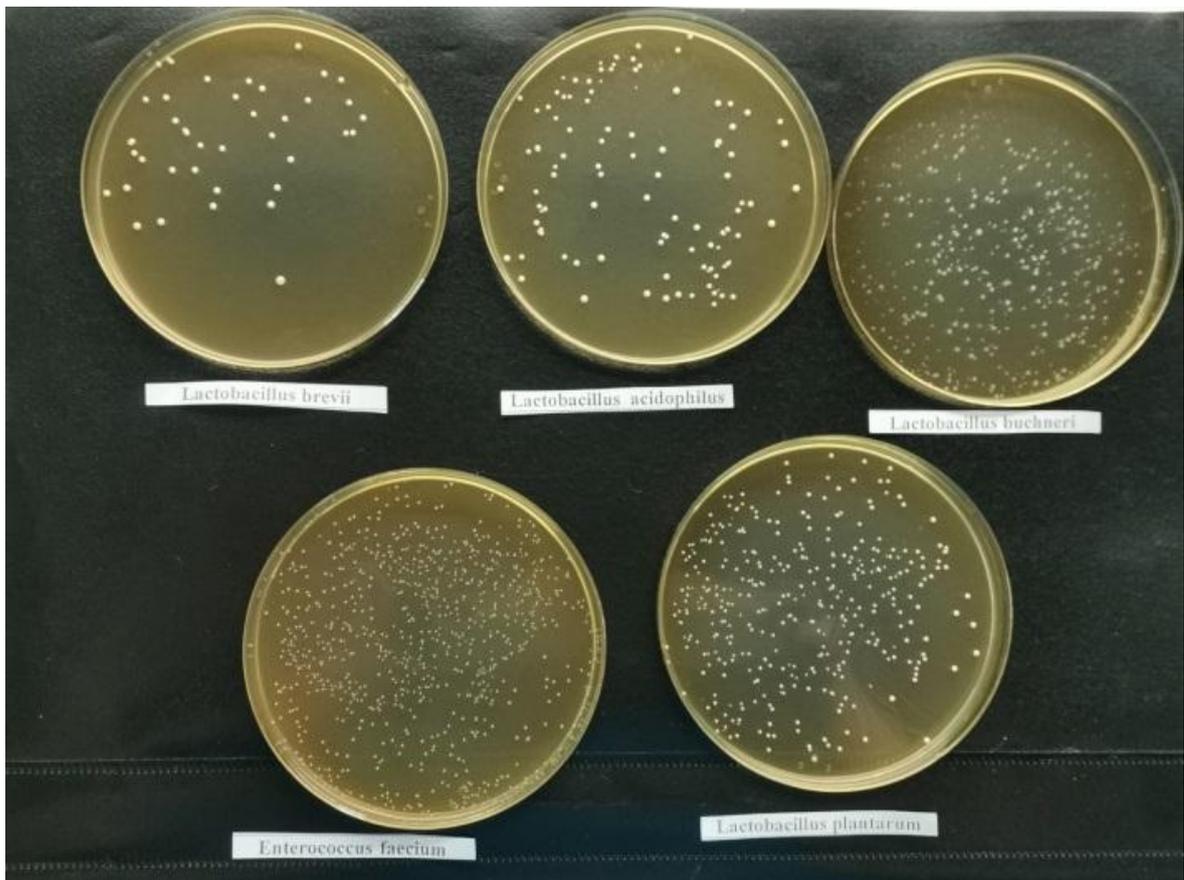


Рисунок 7 – Рост на чашках Петри разных видов *Lactobacillus* spp.

3.3. Идентификация аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

После выделения чистых культур лактобактерий, был проведен комплекс исследований, последовательность которых отражена на рисунке 8.



Рисунок 8 – Общая схема исследований, проведенных в рамках магистерской диссертации

3.3.1. MALDI-TOF масс-спектрометрия

Ранее основой для видовой идентификации лактобацилл было изучение их биохимических свойств, в частности способность ферментировать углеводы, что, если принять во внимание вариабельность этих свойств, нередко может приводить к неточности при идентификации, особенно при работе с близкородственными микроорганизмами. В современных методических документах рекомендуется использовать молекулярно-генетические методы, в частности секвенирование фрагментов гена 16S рРНК. Этот метод позволяет проводить точную видовую идентификацию, но не отражает штаммовые особенности микроорганизмов. Широкие возможности и перспективы для изучения штаммовых характеристик открывает метод MALDI TOF масс-спектрометрии, который позволяет не только идентифицировать микроорганизм по роду и виду, но и,

в ряде случаев, получать уникальный набор рибосомальных белков (фингерпринт) для каждого из исследуемых штаммов.

Кроме точной видовой идентификации промышленно перспективных штаммов лактобацилл, обязательным является изучение их биологических свойств, в частности подробная характеристика их биохимического профиля и антагонистической активности. Дальнейшая идентификация проводилась после морфологического подтверждения клонов аутоштаммов лактобактерий с применением масс-спектрометрии по микробным маркерам из числа высших жирных кислот (Точилина и др., 2015) (рисунок 9).

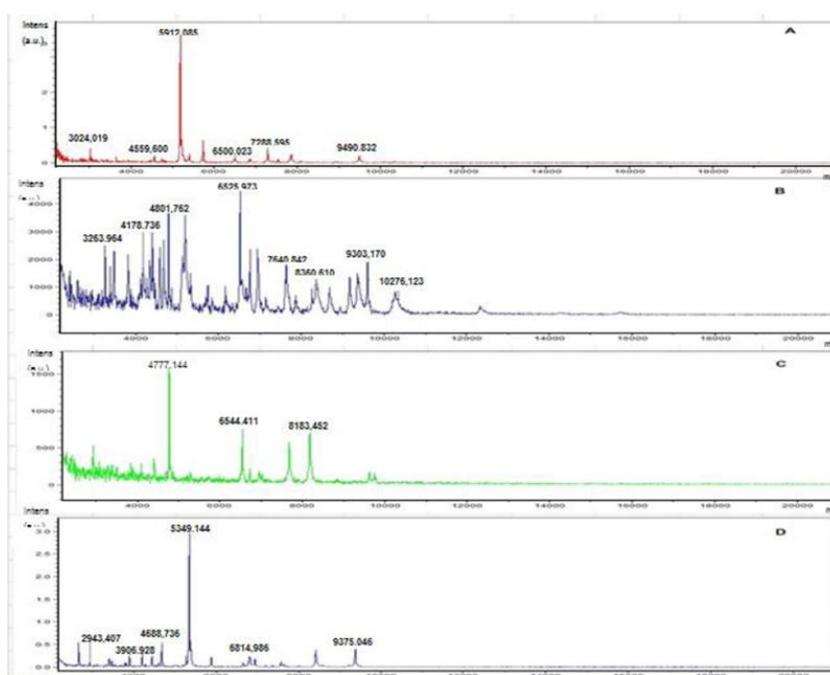


Рисунок 9 – График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK[®] MS

Рисунки отражают результаты MALDI TOF-анализа в форме графиков, ось абсцисс которых отражает значения отношения m/z для каждого пика, а ось ординат - частоту регистрации каждого пика.

3.3.2. Видовое разнообразие и секвенирование, выделенных *Lactobacillus* spp.

В результате исследований были выделены 182 штамма *Lactobacillus* spp., которые с помощью микробиологических исследований и масс-спектрометрии были идентифицированы до видов: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. crispatus*. Чаще всего встречались аутоштаммы вида *L. paracasei* (до 45,1%), значительно реже *L. fermentum*, *L. plantarum* (19,2 и 14,8% соответственно) и очень редко выделялись остальные виды (рисунок 10).

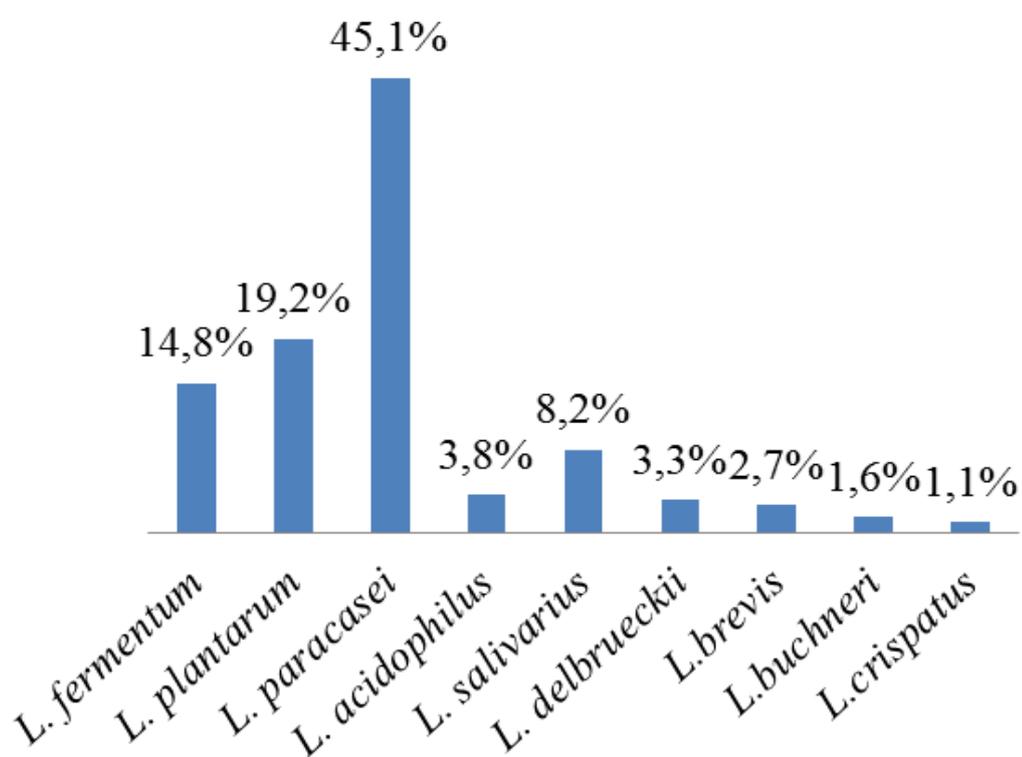


Рисунок 10 – Частота встречаемости разных видов *Lactobacillus* spp. при выделении из кишечника человека при дисбактериозах в данном исследовании

В дальнейшем ходе исследований по способности к адгезии к буккальному эпителию, антагонизму к УПМ и другим характеристикам из 182 аутоштаммов лактобактерий были отобраны наиболее эффективные и перспективные 10 аутоштаммов лактобактерий, филогенетическое

положение которых было подтверждено при секвенировании консервативного гена 16S рРНК (рисунок 11). Все они были депонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) (Москва) (паспорта штаммов в приложении 1), и промаркированы для коллекции ООО НВП «БашИнком» (таблица 4).

Таблица 4 – Наименование штаммов для коллекции

№ п/п	Вид <i>Lactobacillus</i> spp.	Название штамма
1	<i>L. paracasei</i>	9SM
2	<i>L. plantarum</i>	Dec 1
3	<i>L. fermentum</i>	12 Pet
4	<i>L. fermentum</i>	Ku-f
5	<i>L. delbrueckii</i>	14 Ul-d
6	<i>L. paracasei</i>	15 Sul-c
7	<i>L. fermentum</i>	10 POD
8	<i>L. plantarum</i>	7LV
9	<i>L. paracasei</i>	Куз 2
10	<i>L. fermentum</i>	8 AM

Первичный скрининг по базе данных GenBank и RDP-II показал, что исследуемые штаммы принадлежат к следующим систематическим группам: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; *Lactobacillus* spp. Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями типовых штаммов лактобактерий, доступными из базы данных GenBank.

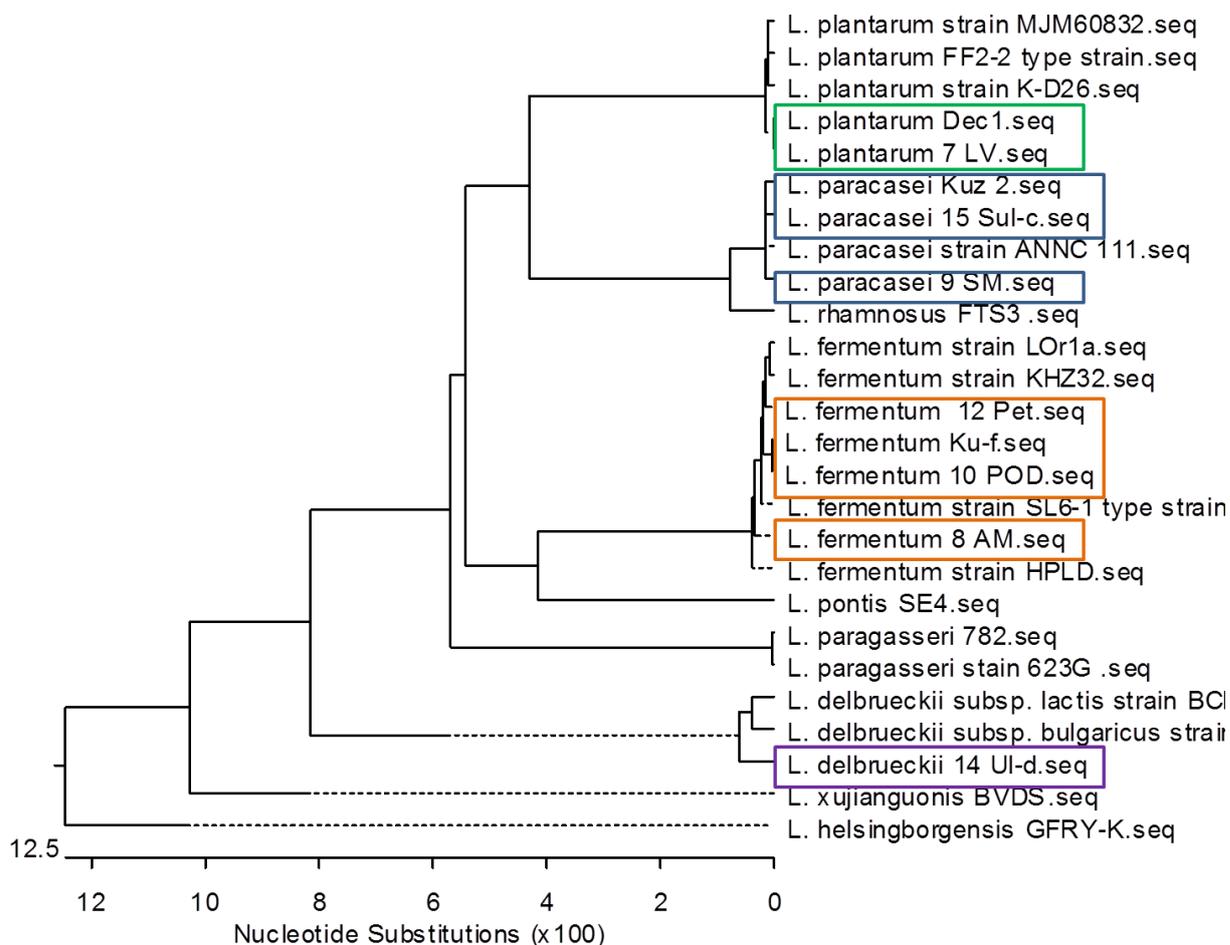
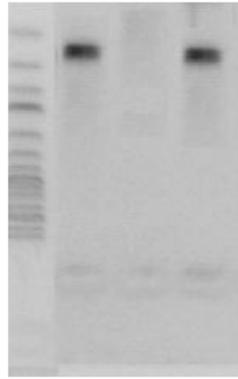


Рисунок 11 – Дендрограмма, построенная на основании анализа последовательности фрагмента гена 16S рНК исследуемых штаммов лактобацилл

Дальнейший анализ по RDP II 16S рНК базе данных показал гомологию с теми же видами бактерий. Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97%. *L. rhamnosus* и *L. paracasei* имеют высокую гомологию между собой, поэтому близкие исследуемые штаммы можно отнести к нескольким видам рода *Lactobacillus*. Для точного определения таксономической принадлежности исследуемых близкородственных штаммов был использован метод идентификации с применением видоспецифических праймеров (рисунок 12).



1 2 3 4

Рисунок 12 – Результаты ПЦР-анализа исследуемого штамма: 1. Маркер O'GeneRuler 1kbp DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п.н, сверху вниз); 2. ПЦР анализ исследуемого штамма с использованием праймеров LU-5 и Lac-2; 3. ПЦР-анализ исследуемого штамма с использованием праймеров LU-5 и RhalI; 4. ПЦР-анализ исследуемого штамма с использованием праймеров LU-5 и Lpar-4

Наработка фрагмента размером 312 п.н. при использовании видоспецифических праймеров LU-5 и Lpar-4 позволяет утверждать, что исследуемый штамм относится к виду *L. paracasei*.

3.4. Изучение адгезивных свойств штаммов *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию человека

Проведенные исследования показали, что выделенные от конкретного человека аутоштаммы лактобактерий обладали наибольшей адгезивностью к буккальным эпителиоцитам того же человека (ИАМ $\geq 40,0$) и, меньшей способностью к адгезии к эпителиоцитам других людей. В то же время, перекрестная адгезия аутоштаммов лактобактерий, полученных от других людей к эпителию конкретного человека показала, что можно выделить

аутоштаммы *Lactobacillus* spp., которые адгезировались к эпителиоцитам разных людей с высоким уровнем индекса адгезии (таблица 5).

В наших исследованиях высоким уровнем адгезии из 182 выделенных от разных людей аутоштаммов лактобактерий обладали высоким уровнем перекрестной адгезии 10 аутоштаммов. Они показали ИАМ $\geq 40,0$ у больше, чем 50% пациентов (рисунок 13).

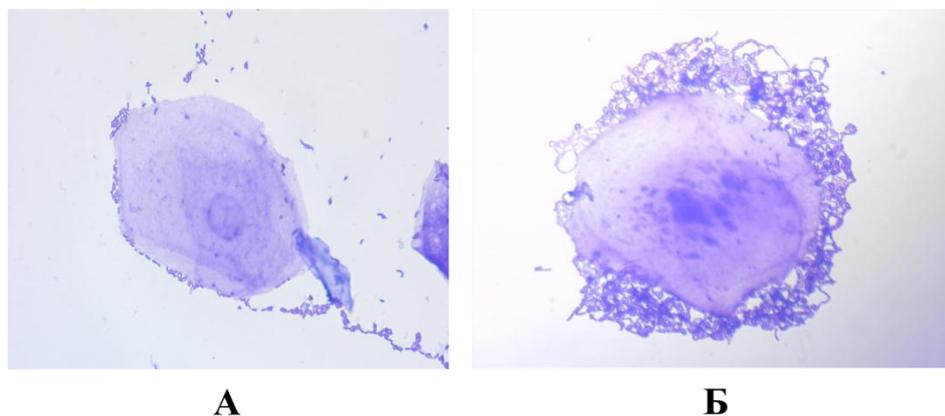


Рисунок 13 – Адгезия *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию. А – низкий индекс адгезии к эпителиоцитам (ИАМ $\geq 10,5 - 20,5$); Б – высокий индекс адгезии к эпителиоцитам (ИАМ ≥ 40).

Таблица 5 – Перекрестная адгезивность аутоштаммов к буккальным эпителиоцитам

аутоштаммы <i>Lactobacillus</i> spp.	Высокая *ИАМ ≥ 40	Средняя, *ИАМ $\geq 20,51 - 39,5$	Низкая, *ИАМ \geq $10,5 - 20,5$	Неадгезивная, ИАМ $\leq 10,5$
9SM	70%	20%	10%	0
Dec 1	70%	20%	10%	0
12 Pet	50%	40%	10%	0
Ku-f	50%	40%	10%	0
14 UI-d	60%	10%	30%	0

15 Sul-c	70%	20%	10%	0
10 POD	80%	20%	0	0
7LV	70%	20%	10%	0
Куз 2	60%	30%	10%	0
8AM	40%	40%	20%	0

*Индекс адгезивности микроорганизмов

Высокая адгезивная способность штаммов важна для прикрепления к слизистой стенке кишечника и образования биопленок. Адгезия кишечных бактерий к эпителиальным клеткам является важным шагом к заселению слизистой кишечника или возникновению заболевания в случае наличия УПМ. Патогенные бактерии связываются с рецепторами эпителиальных клеток кишечника и образуют плотные контакты, размножаются и продуцируют ферменты или токсины, вызывающие заболевание у человека, они также могут образовывать плотную биопленку, что увеличивает их резистентность к терапевтическим препаратам (Jamal et al., 2018).

Lactobacillus spp. с высокой адгезивной способностью могут ингибировать активность патогенных бактерий, которые колонизируют кишечный тракт, а также могут уменьшать взаимодействие между патогенными бактериями и слизистой оболочкой кишечника, конкурируя за рецепторы для адгезии эпителиальных клеток, и ингибировать образование биопленок патогенными бактериями (Barzegari et al., 2020; Vasiee et al., 2022; Gou et al., 2022). Поэтому исследование адгезивных способностей лактобактерий имеют большую значимость.

Например, показано, что пробиотики на основе *Pediococcus pentosaceus* 2–5 и *L. reuteri* L-3 ингибировали рост и адгезию энтеропатогенных бактерий к клеткам Caco-2, за счет своей высокой

адгезивной способности к данным клеткам (26,37% и 21,57% соответственно) (Wang et al., 2022).

Наши результаты показали, что выделенные 10 аутоштаммов *Lactobacillus* spp. лактобактерий обладают высоким уровнем перекрестной адгезии. Они показали ИАМ $\geq 40,0$ больше, чем у 50% пациентов. Самую лучшую адгезию показал аутоштамм 10 POD (ИАМ $\geq 40,0$ у 80% исследуемых пациентов). Таким образом, штаммы *Lactobacillus* spp., которые имели высокий уровень адгезии к эпителиоцитам не только конкретного человека – донора аутоштамма, но и к эпителиоцитам других людей, имеют универсальные адгезивные свойства и могут быть предложены в качестве универсального пробиотика.

3.5. Антагонизм и кислотообразующая активность аутоштаммов

3.5.1. Определение антагонистической активности аутолактобактерий методом блоков и штрихов

Способность аутоштаммов лактобактерий подавлять рост УПМ (антагонистическая активность) определялась методом отсроченного антагонизма (метод блоков). Для измерения зоны подавления УПМ была проведена серия экспериментов по их определению. В качестве тест-штаммов УПМ выступали *E. coli* и *S. aureus*.

Отобранные 10 аутоштаммов показали хорошую антагонистическую активность к УПМ (рисунок 14).

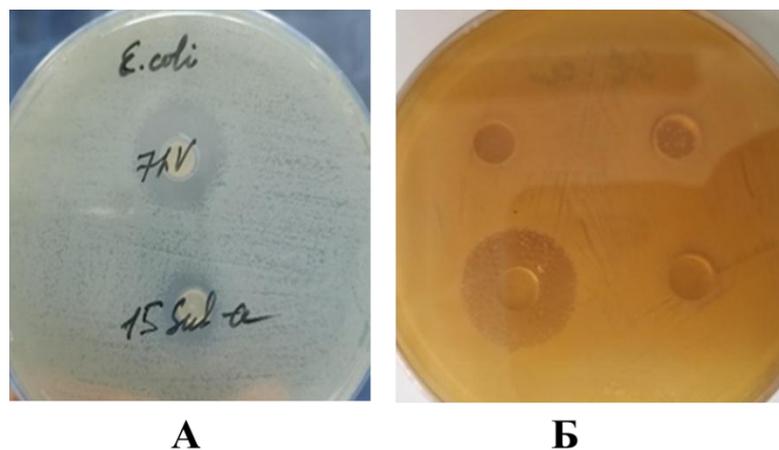


Рисунок 14 – Проверка антагонизма аутоштаммов лактобактерий к УПМ: *E. coli* (А) и *S. aureus* (Б) методом блоков

3.5.2. Определение антагонистической активности аутолактобактерий методом перпендикулярных штрихов

При исследованиях методом штрихов измеряли зону подавления *S. aureus* и *E. coli* аутоштаммами *Lactobacillus* spp. (таблица 6 и 7, рисунок 15).

Таблица 6 – Антагонизм аутоштаммов к УПМ

Название штамма	Зона подавления УПМ, мм (метод блоков и штрихов)		Титр КОЕ/мл
	<i>S. aureus</i> , мм	<i>E. coli</i> , мм	
<i>L. paracasei</i> 9SM	22±2	23±2	1,3*10 ⁸
<i>L. plantarum</i> Dec 1	22±1	25±2	1,7*10 ⁸
<i>L. fermentum</i> 12 Pet	22±1	24±3	3,2*10 ⁸
<i>L. fermentum</i> Ku-f	24±2	25±3	4,4*10 ⁸

<i>L. delbrueckii</i> 14 Ul-d	23±2	24±3	3,8*10 ⁸
<i>L. paracasei</i> 15 Sul-c	19±1	20±2	1,2*10 ⁸
<i>L. fermentum</i> 10 POD	22±1	23±2	3,8*10 ⁸
<i>L. plantarum</i> 7LV	23±2	27±1	1,2*10 ⁸
<i>L. paracasei</i> Кыз 2	21±1	23±1	9,2*10 ⁸
<i>L. fermentum</i> 8 AM	19±1	20±2	1,3*10 ⁸

Как следует из полученных данных, исследования антагонизма методом блоков и штрихов дают сравнимые показатели. В среднем зона подавления *S. aureus* составила 21,7 мм, а *E. coli* - 23,4 мм.

Сравнительная оценка антагонизма аутоштаммов лактобактерий к УПМ представлена на диаграмме (рисунок 15).

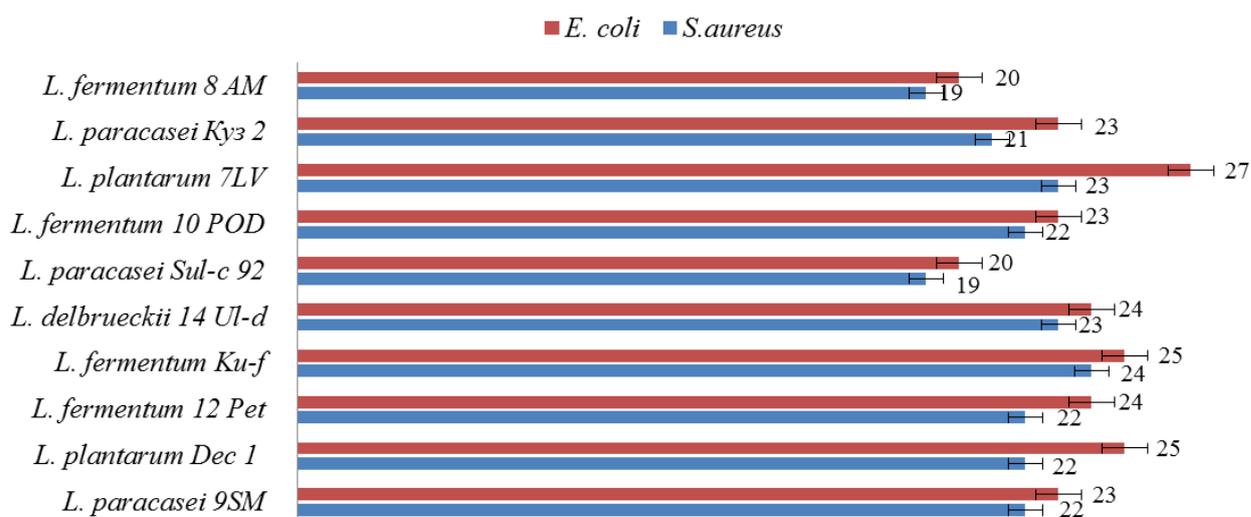
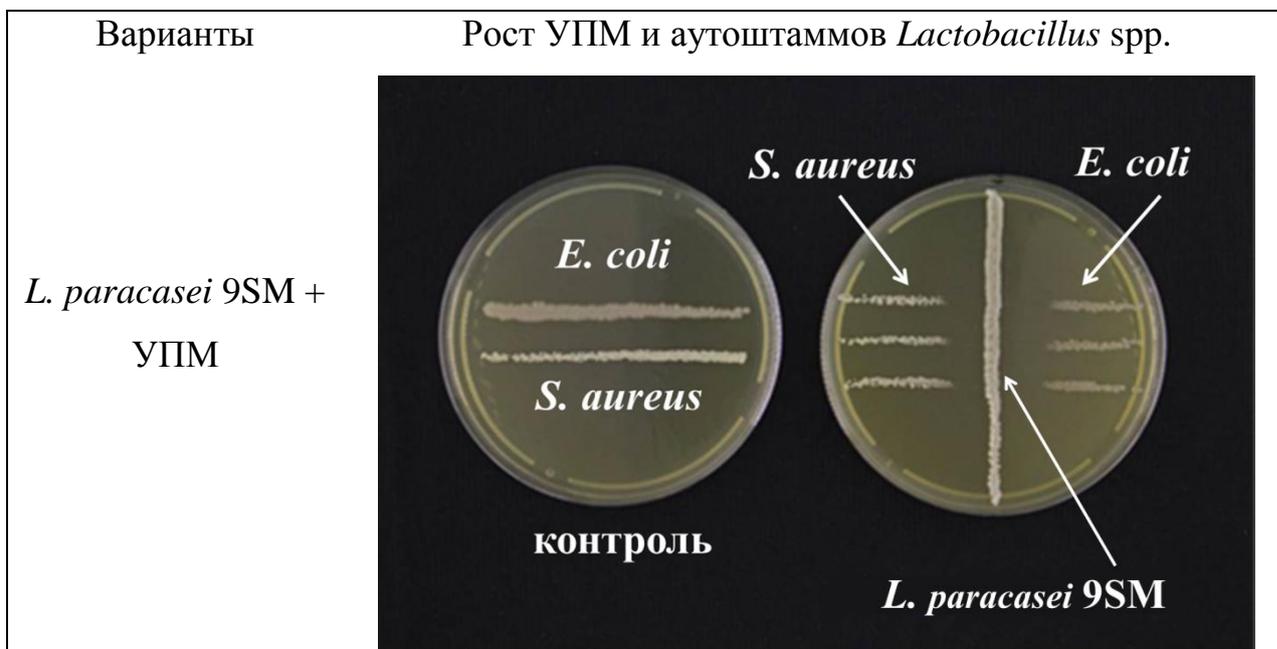


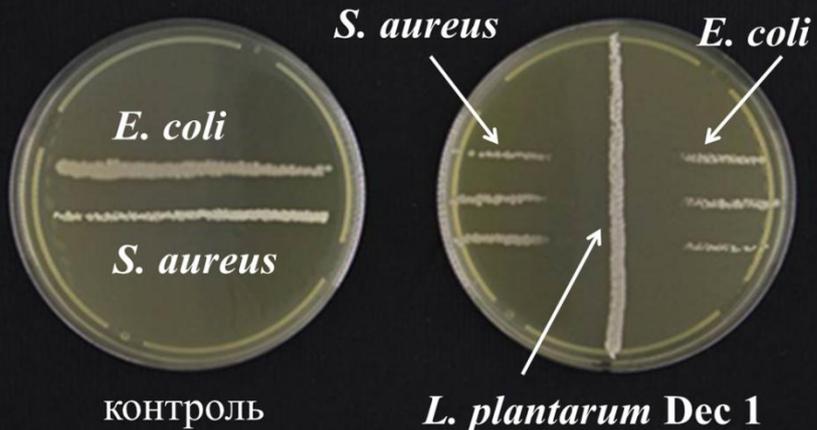
Рисунок 15 – Зона подавления условно-патогенных *S. aureus* и *E. coli* разными аутоштаммами *Lactobacillus* spp. (в мм)

Наилучшими ингибирующими *E. coli* способностями обладали аутоштаммы лактобактерий 7LV, Ku-f и № Dec 1. Зона подавления *S. aureus* аутоштаммами лактобацилл была несколько ниже, чем у *E. coli*, наиболее эффективны оказались аутоштаммы 7LV, 14 Ul-d и Ku-f.

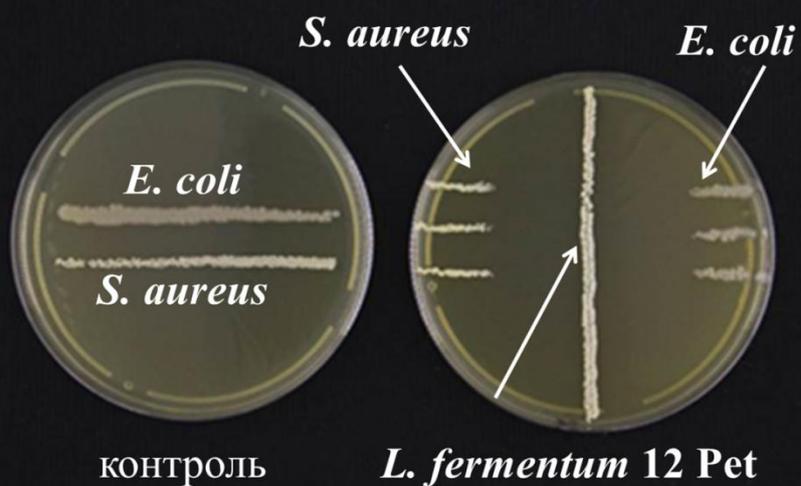
Таблица 7 – Визуальный рост УПМ и аутоштаммов *Lactobacillus* spp.



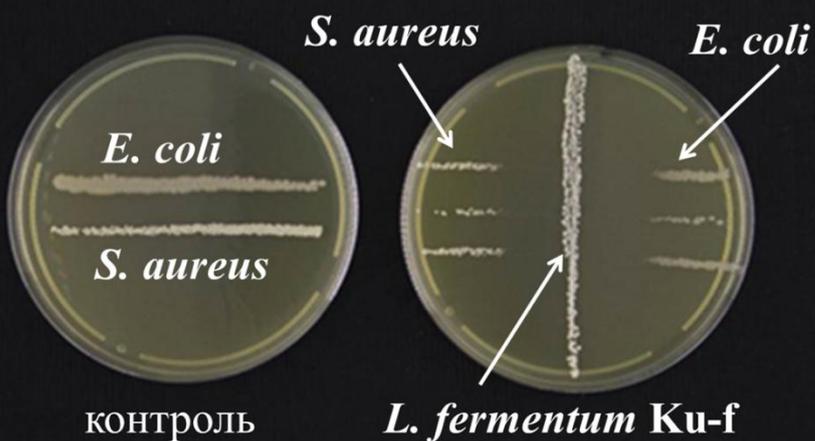
L. plantarum Dec 1
+ УПМ



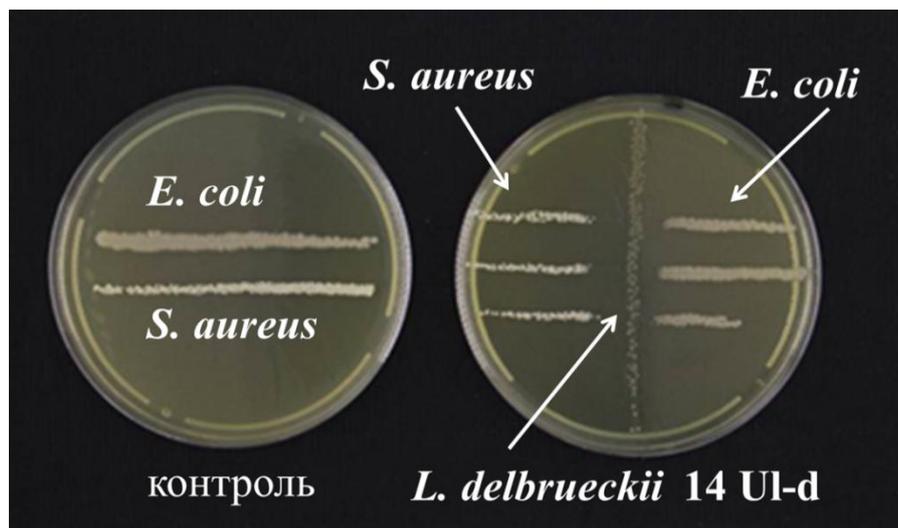
L. fermentum 12 Pet
+ УПМ



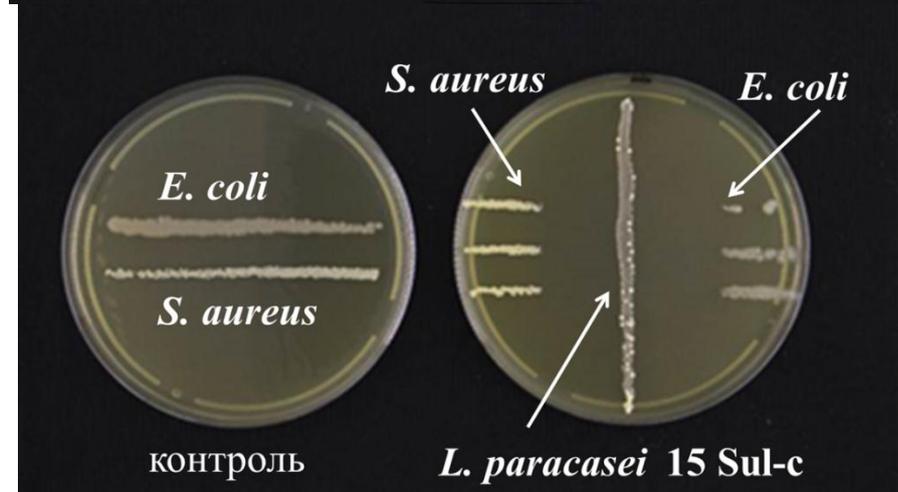
L. fermentum Ku-f
+ УПМ



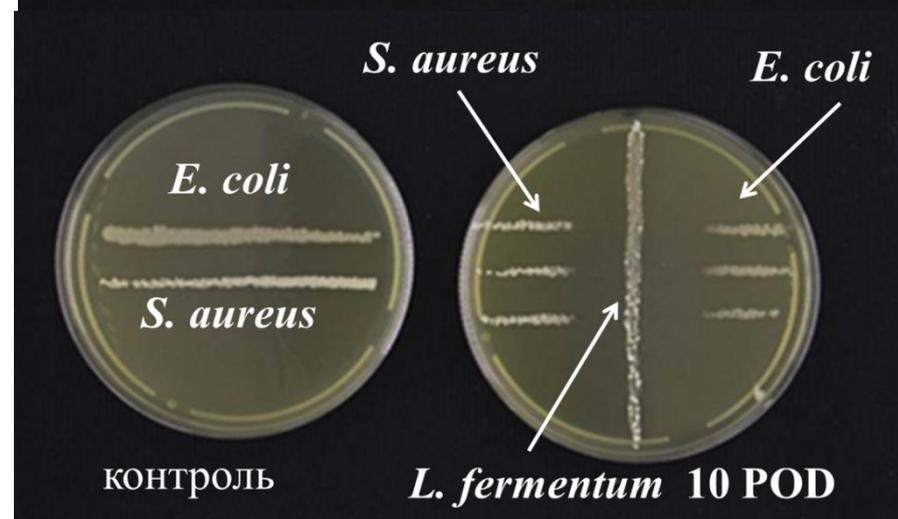
L. delbrueckii
14 UI-d + УПМ



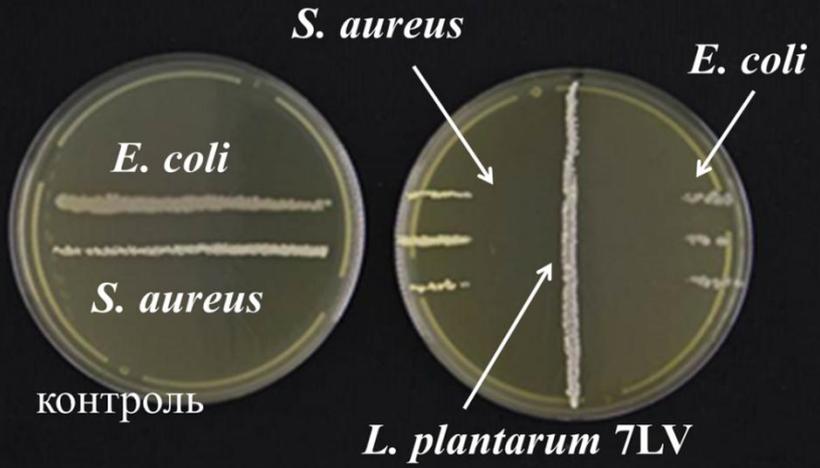
L. paracasei
15 Sul-c + УПМ



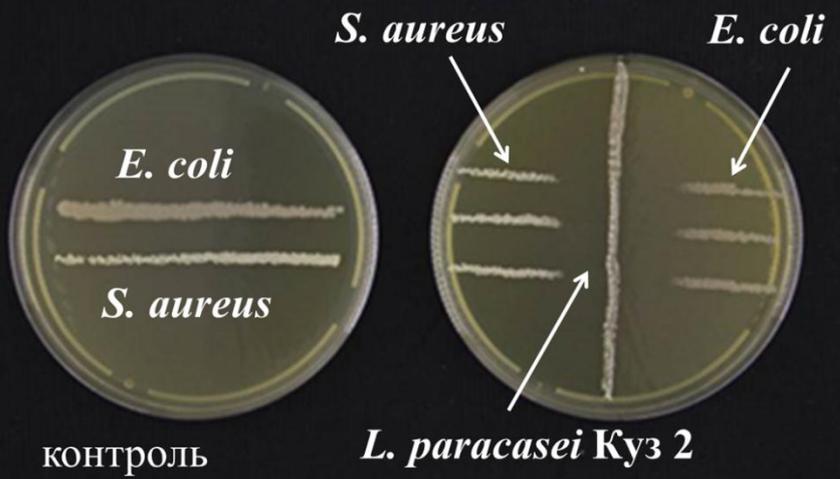
L. fermentum
10 POD + УПМ



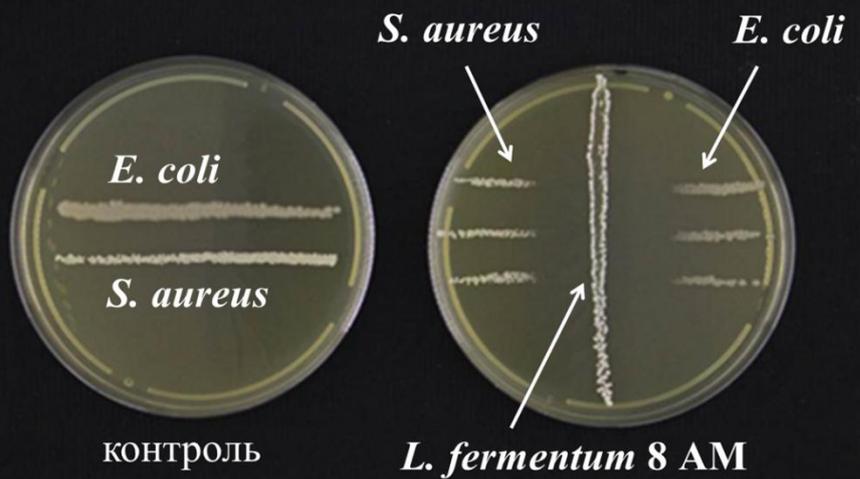
L. plantarum 7LV +
УПМ



L. paracasei Куз 2
+ УПМ



L. fermentum 8 AM
+ УПМ



*1 линия – в контроле *E. coli*, **2 линия – в контроле *S. aureus*

Выраженное антагонистическое действие аутоштаммов лактобактерий на УПМ является важным свойством пробиотических бактерий, поскольку препятствует колонизации УПМ слизистой ЖКТ. Механизмы действия лактобактерий на кишечные патогены сложны и многофакторны, но, в основном, включают выработку ингибирующих веществ, ингибирование адгезии патогенных бактерий, модуляцию иммунной системы и улучшение барьерной функции организма (Mathipa et al., 2017). Аутоштаммы *Lactobacillus* spp. ингибируют прикрепление и размножение патогенных бактерий в кишечнике, поскольку основным механизмом кишечной инфекции является адгезия патогенных бактерий к поверхности слизистой оболочки кишечника.

Ингибирование роста патогенов и УПМ под влиянием штаммов лактобактерий происходит за счет продукции бактериоцинов. Под действием межклеточных феромонов клетки начинают вырабатывать молекулы-мессенджеры, которые, накапливаясь в среде, сигнализируют о приросте бактериальной популяции и активируют каскад реакций, результатом которого является стимуляция бактериальных клеток и выработка ими антимикробных пептидов. Именно спектр активности вырабатываемых бактериоцинов определяет степень антагонизма штамма и обуславливает характер межбактериальных взаимодействий (Соловьева и др., 2010).

Антагонистические свойства *Lactobacillus* spp. обусловлены не только продукцией органических кислот (молочной, уксусной), но также молекулами пероксида водорода и образованием субстанций, схожих с антибиотиками. По мнению ряда исследователей, именно образование указанных органических кислот из углеводов приводит к снижению pH среды и предотвращает развитие других микроорганизмов. Пероксид водорода, который в процессе роста каталазоотрицательных микроорганизмов

аккумулируется в среде, оказывает ингибирующее действие на рост каталазоположительных бактерий за счет сильного окислительного действия на молекулярные структуры их белков (Соловьева и др., 2010). Процесс синтеза бактериоцинов контролируется и синхронизируется межклеточными коммуникативными взаимодействиями («чувство кворума») и является механизмом, позволяющим изменять плотность клеточной популяции (Quadri, 2002; Kleerebezem, 2004).

Данные о межвидовых взаимоотношениях микроорганизмов, полученные нами, позволили выделить группу бактерий рода *Lactobacillus*, наиболее перспективных в отношении совместного культивирования. Наши исследования показали, что все отобранные штаммы *Lactobacillus* spp. активно ингибируют рост *E. coli* и *S. aureus*, что говорит об их высокой эффективности. Но наибольший интерес из изученной группы лактобактерий представляют штаммы 7LV, Dec 1, 14 Ul-d и Ku-f. Эти микроорганизмы обладают выраженным антагонизмом по отношению к условно-патогенным микроорганизмам и устойчивостью к спектру антибактериальных средств.

3.5.3. Изучение кислотообразующей активности *Lactobacillus* spp.

Важным свойством пробиотических бактерий является их способность к кислотообразованию. Снижая кислотность кишечного содержимого лактобактерии препятствуют размножению УПМ. Нами было проведено изучение кислотообразующей способности аутоштаммов лактобактерий. Все исследуемые штаммы имели высокую степень кислотообразования, что

также показывает эффективность *Lactobacillus* spp. создавать кислую среду (таблица 8).

Таблица 8 – Кислотообразующая активность *Lactobacillus* spp.

Аутоштаммы	9S M	Dec 1	12 Pet	Ku- f	14 Ul-d	15 Sul-c	10 POD	7 LV	Куз 2	8 AM
Кислотообразующая активность (°Т)	250	235	255	250	250	250	200	247	250	225

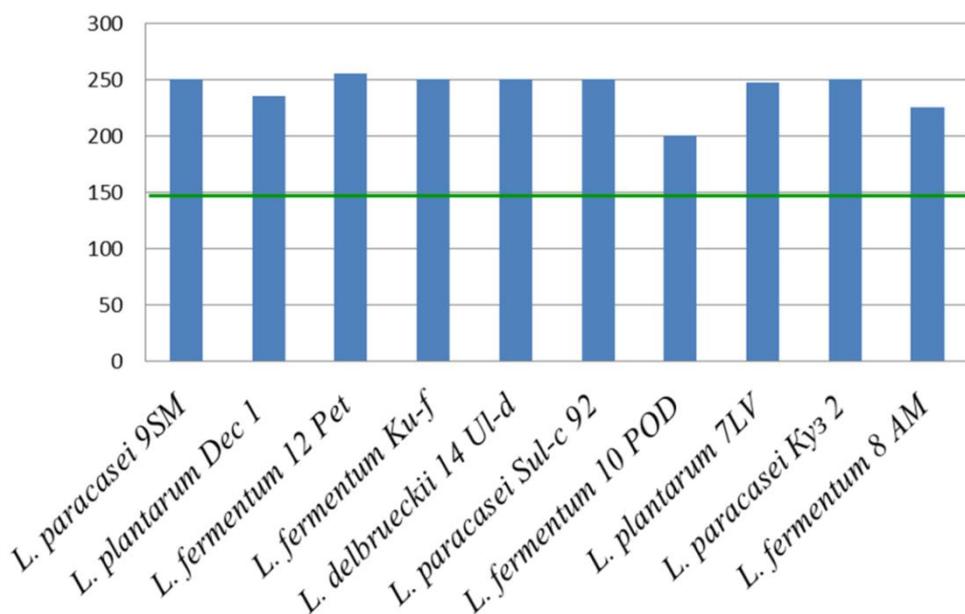


Рисунок 16 – Кислотообразующая активность аутоштаммов *Lactobacillus* spp. (более 150.0 °Т – высокая активность)

Учет результатов проводили согласно полученным данным, где кислотообразование выше 150.0 °Т считается высоким показателем. Сравнительный анализ уровня кислотообразующей активности представлен на диаграмме (рисунок 16).

Основным продуктом метаболизма *Lactobacillus* spp. является молочная кислота, так как лактобактерии сами по себе активные кислотообразователи. Многие авторы в своих исследованиях считали, что снижение pH кишечного содержимого за счет присутствия молочной кислоты является основным способом ингибирования роста патогенных микроорганизмов. Но позднее было показано, что наличие только молочной кислоты не дает такого эффекта. Антимикробная активность зависит не столько от величины pH, сколько от совместного присутствия молочной, уксусной и пропионовой кислот, вырабатываемых *Lactobacillus* spp. Такое сочетание продуктов метаболизма лактобактерий обеспечивает ингибирование не только бактериальных культур, но и некоторых видов дрожжей. При этом практически не затрагивается кислотоустойчивая нормальная микробиота человека (Зюбр и др., 2008).

3.6. Изучение антибиотикоустойчивости аутоштаммов

***Lactobacillus* spp.**

Антибиотикоустойчивость исследовали с помощью стандартных дисков с антибиотиками на чашках Петри (ДДМ-методом) (рисунок 17).

Все исследуемые штаммы были проверены на устойчивость к антибиотикам: ванкомицин (ВА) 30 мкг, меропенем (МПН) 10 мкг, амикацин (АН) 30 мкг, рифампицин (РИФ) 5 мкг, тетрациклин (ТЕТ) 30 мкг, норфлоксацин (НОР) 10 мкг, левофлоксацин (ЛФЦ) 5 мкг, эритромицин (ЭРИ) 15 мкг, кларитромицин (КТМ) 15 мкг, азитромицин (АРН) 15 мкг, гентамицин (ГЕН) 10 мкг, цефтриаксон (ЦРО) 30 мкг, цефтазидим (ЦАЗ) 30 мкг, цефотаксим (ЦТК) 30 мкг, цефепим (ЦПМ) 30 мкг, имипенем (ИМ) 10 мкг, амоксициллин (АКЦ) 20

мкг, ампициллин (АМП) 10 мкг, бензилпенициллин (ПЕН) 10 мкг, левомицетин (ЛЕВ) 30 мкг.

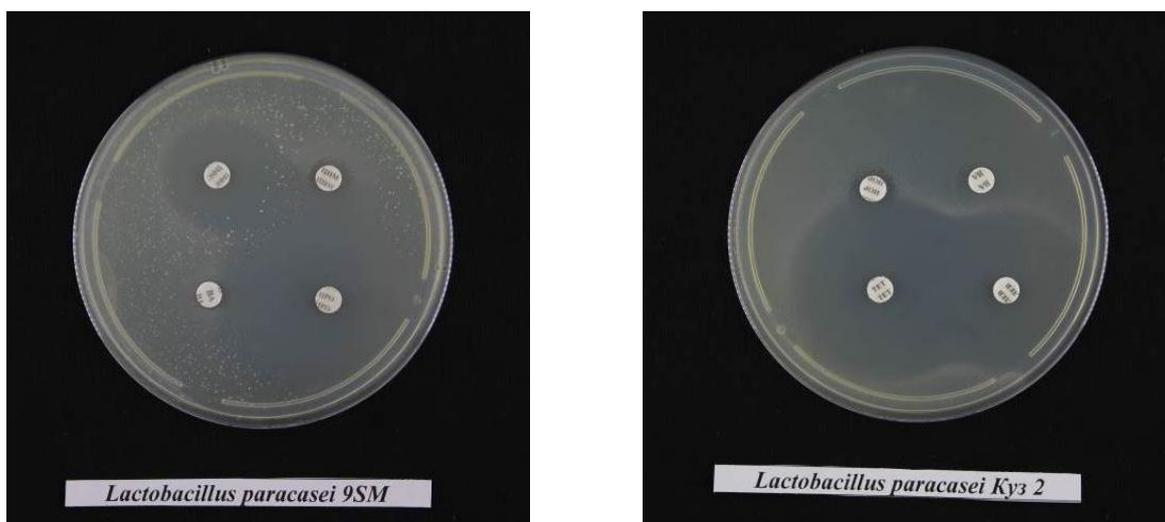


Рисунок 17 – Антибиотикочувствительность на чашках Петри ДДМ-методом.

Устойчивость (или чувствительность) к антибиотикам оценивали по диаметру зоны задержки роста возле дисков с антибиотиками. У устойчивых к антибиотику штаммам зона задержки роста составляла от 0 до 10 мм (диаметр оценивали вместе с диаметром диска), чувствительные штаммы давали задержку роста возле диска с диаметром более 11 мм. Результаты исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Зона подавления роста аутоштаммов (9SM, Dec 1, 8 AM, 12 Pet, Ku-f) разными антибиотиками

Антибиотик\Культура	№1 9SM L. paracasei	№2 Dec 1 L. plantarum	№3 8 AM L. fermentum	№4 12 Pet L. fermentum	№5 Ku-f L. fermentum
Ванкомицин (ВА) 30 мкг	0*	0	0	0	0
Меропенем (МПН) 10 мкг	40±2***	42±2	39±2	39±2	41±2
Амикацин (АН) 30 мкг	20±2**	20±2	21±2	38±2	20±2

Рифампицин (РИФ) 5 мкг	33±2	30±2	23±2	38±2	40±2
Тетрациклин (ТЕТ) 30 мкг	42±2	39±2	20±2	36±2	25±2
Норфлоксацин(НОР) 10 мкг	16±2	0	10±2	29±2	10±2
Левифлоксацин (ЛФЦ) 5 мкг	27±2	20±2	27±2	38±2	23±2
Эритромицин (ЭРИ) 15 мкг	37±2	39±2	35±2	39±2	41±2
Кларитромицин (КТМ) 15 мкг	41±2	40±2	35±2	42±2	39±2
Азитромицин (АРН) 15 мкг	34±2	35±2	28±2	40±2	32±2
Гентамицин (ГЕН) 10 мкг	32±2	26±2	20±2	37±2	25±2
Цефтриаксон (ЦРО) 30 мкг	45±2	38±2	42±2	39±2	35±2
Цефтазидим (ЦАЗ) 30 мкг	30±2	40±2	29±2	36±2	20±2
Цефотаксим (ЦТК) 30 мкг	42±2	39±2	41±2	39±2	30±2
Цефепим (ЦПМ) 30 мкг	17±2	36±2	40±2	41±2	25±2
Имипенем (ИМ) 10 мкг	30±2	36±2	42±2	43±2	43±2
Амоксициллин (АКЦ) 20 мкг	44±2	42±2	42±2	42±2	39±2
Ампициллин (АМП) 10 мкг	44±2	39±2	38±2	37±2	40±2
Бензилпенициллин (ПЕН) 10 мкг	43±2	38±2	25±2	41±2	39±2
Левомецетин (ЛЕВ) 30 мкг	30±2	38±2	20±2	37±2	41±2

* Зеленый цвет ячеек – устойчивость к АБП;

** Оранжевый цвет ячеек – средний размер зон подавления;

*** Красный цвет ячеек – большой размер зон подавления.

Таблица 10 – Зона подавления роста аутоштаммов (Куз 2, 7LV, 10 POD, 14 Ul-d, 15 Sul-) с разными антибиотиками

Антибиотик\Культура	№6 Куз 2 <i>L. paracasei</i>	№7 7LV <i>L. plantarum</i>	№8 10 POD <i>L. fermentum</i>	№9 14 Ul-d <i>L. delbrueckii</i>	№10 15 Sul-c <i>L. paracasei</i>
Ванкомицин (ВА) 30 мкг	0*	0	0	0	0
Меропенем (МПН) 10 мкг	40±2***	43±2	30±2	41±2	42±2
Амикацин (АН) 30 мкг	20±2**	15±2	20±2	38±2	33±2
Рифампицин (РИФ) 5 мкг	39±2	25±2	41±2	38±2	39±2
Тетрациклин (ТЕТ) 30 мкг	45±2	20±2	30±2	29±2	29±2
Норфлоксацин(НОР) 10 мкг	10±2	0	19±2	34±2	10±2
Левофлоксацин (ЛФЦ) 5 мкг	28±2	15±2	25±2	42±2	39±2
Эритромицин (ЭРИ) 15 мкг	39±2	30±2	35±2	39±2	41±2
Кларитромицин (КТМ) 15 мкг	41±2	35±2	39±2	33±2	30±2
Азитромицин (АРН) 15 мкг	35±2	25±2	25±2	41±2	34±2
Гентамицин (ГЕН) 10 мкг	25±2	20±2	20±2	36±2	37±2
Цефтриаксон (ЦРО) 30 мкг	30±2	40±2	39±2	35±2	36±2
Цефтазидим (ЦАЗ) 30 мкг	20±2	27±2	40±2	39±2	39±2
Цефотаксим (ЦТК) 30 мкг	41±2	37±2	42±2	41±2	39±2
Цефепим (ЦПМ) 30 мкг	20±2	40±2	41±2	40±2	20±2
Имипенем (ИМ) 10 мкг	40±2	39±2	38±2	43±2	40±2
Амоксициллин (АКЦ) 20 мкг	41±2	43±2	39±2	40±2	41±2
Ампициллин (АМП) 10 мкг	41±2	40±2	35±2	38±2	38±2

Бензилпенициллин (ПЕН) 10 мкг	35±2	28±2	35±2	39±2	36±2
Левомецетин (ЛЕВ) 30 мкг	39±2	25±2	30±2	35±2	41±2

* Зеленый цвет ячеек – устойчивость к АБП;

** Оранжевый цвет ячеек – средний размер зон подавления;

*** Красный цвет ячеек – большой размер зон подавления.

Анализ данных изучения антибиотикоустойчивости аутоштаммов лактобактерий показал, что все 10 штаммов проявили устойчивость к ванкомицин (ВА) 30 мкг (таблицы 9 и 10). Данный антибиотик относится к группе гликопептидов, который оказывает бактерицидное действие, нарушает синтез клеточной стенки, проницаемость цитоплазматической мембраны и синтез РНК бактерий. Активен в отношении грамположительных бактерий: *Staphylococcus* spp. (включая штаммы, продуцирующие пенициллиназу и метициллинрезистентные штаммы), *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Actinomyces* spp., *Clostridium* spp. (в т.ч. *Clostridium difficile*).

Промежуточную устойчивость к антибиотику норфлоксацину имели штаммы 8 AM, Ku-f, Куз 2 и 15 Sul-c, устойчивыми оказались Dec 1 и 7LV (таблицы 7 и 8). Норфлоксацин – противомикробное синтетическое средство группы фторхинолонов широкого спектра действия. Оказывает бактерицидное действие, подавляя ДНК-гиразу, нарушает процесс суперспирализации ДНК. Высокоактивен в отношении большинства грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Klebsiella* spp. (в т.ч. *Klebsiella pneumoniae*), *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Providencia* spp., *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*,

Neisseria meningitidis. Активен в отношении некоторых грамположительных бактерий (в т.ч. *S. aureus*).

В таблице по окраске ячеек можно определить к каким антибиотикам аутоштаммы имели наибольшую чувствительность (более 40 мм) (красный цвет ячеек) и средний размер зон подавления (от 15 до 25 мм) (оранжевый цвет ячеек).

Показатели устойчивости к антибиотикам могут быть интересны врачам-клиницистам для лечения кишечных инфекций, где одновременный прием пробиотиков на основе лактобактерий с антибиотиками может повлиять на эффективность терапии. Известно, что некоторые виды лактобацилл обладают природной устойчивостью к ванкомицину и аминогликозидам (Gueimonde et. al., 2013; Sivamaruthi et. al., 2020), тогда как другие гликопептиды обладают различной активностью в отношении разных видов и штаммов (Wang et. al., 2020). То есть чаще всего встречается устойчивость к метронидазолу и ванкомицину, соответственно не погибают при одновременном лечении данными антибиотиками. Одновременно с этим многие виды восприимчивы к пенициллину и ампициллину, поэтому при лечении рекомендуется соблюдать осторожность (Goldstein et. al., 2015). В данном исследовании отобранные штаммы также имели устойчивость к ванкомицину, а штаммы Dec 1 и 7LV к норфлоксацину. Соответственно при лечении данными антибиотиками возможно одновременное применение и антибиотиков и пробиотиков на основе соответствующих аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

3.7. Биосовместимость аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

Для создания пробиотического консорциума на дальнейших этапах работы проанализирована биосовместимость культур аутоштаммов методом

совместного культивирования на агаризованной питательной среде. В зонах совмещенного проникновения культуры развивались при взаимном присутствии (совместное культивирование), конкурируя друг с другом (таблицы 11 и 12).

При задержке роста одной из исследуемых культур взаимоотношения между ними рассматривались как антагонистические, а сами культуры относили в категорию бионесовместимых. Культуры считали биосовместимыми в случае отсутствия взаимного подавления роста друг друга или усиления роста исследуемых штаммов в зоне совместного культивирования (мутуализм, синергизм, сателлизм) (Точилина и др., 2015).

Таблица 11 – Биосовместимость аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

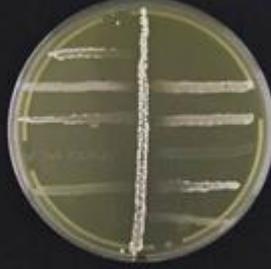
<i>Lactobacillus</i> spp.	9SM	Dec 1	8 AM	12 Pet	Ku-f	Куз 2	7LV	10 POD	14 UI-d	15 Sul-c
9SM		+	+	+	-**	+	-	+	+	+
Dec 1	+		+	+	-	-	-	+	+	-
8 AM	+	+		+	-	-	-	-	+	-
12 Pet	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Ku-f	-	-	-	+		+	+	+	+	+
Куз 2	+	-	-	+	+		-	+	+	+
7LV	+	-	-	+	-	-		+	+	-
10 POD	+	+	-	+	+	+	+		-	+
14 UI-d	+	+	+	+	+	+	+	-		-
15 Sul-c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	

+* – положительная биосовместимость

-* – есть зона задержки роста

Таблица 12 – Варианты взаимной биосовместимости аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

Аутоштаммы	Визуализация на чашках Петри	
<p>1 <i>L. paracasei</i> 9SM</p>		
<p>2 <i>L. plantarum</i> Dec 1</p>		

<p>3 <i>L. fermentum</i> 8 AM</p>		 <p><i>Lactobacillus fermentum</i> 8AM</p>	
<p>4 <i>L. fermentum</i> 12 Pet</p>		 <p><i>Lactobacillus fermentum</i> 12 Pet</p>	
<p>5 <i>L. fermentum</i> Ku-f</p>		 <p><i>Lactobacillus fermentum</i> Ku-f</p>	
<p>6 <i>L. paracasei</i> Ky3 2</p>		 <p><i>Lactobacillus paracasei</i> Ky3 2</p>	

<p>7 <i>L. plantarum</i> 7LV</p>		 <p><i>Lactobacillus plantarum</i> 7LV</p>	
<p>8 <i>L. fermentum</i> 10POD</p>		 <p><i>Lactobacillus fermentum</i> 10 POD</p>	
<p>9 <i>L. delbrueckii</i> 14 Ul-d</p>		 <p><i>Lactobacillus delbrueckii</i> 14 Ul-d</p>	
<p>10 <i>L. paracasei</i> 15 Sul-c</p>		 <p><i>Lactobacillus paracasei</i> 15 Sul-c</p>	

При исследовании межштаммовой биосовместимости *Lactobacillus* spp. результаты интерпретировали следующим образом: в случае, когда штаммы не мешали росту друг друга, обозначали «+», то есть культуры биосовместимы, в случае антагонизма одного штамма другим – «-», то есть штаммы плохо совместимы или бионесовместимы (Точилина и др., 2015).

Наибольший антагонизм наблюдался при исследовании комбинации штаммов *L. plantarum* 7LV и *L. plantarum* Dec 1. В этом случае при совместном выращивании на плотной питательной среде наблюдалась выраженная зона задержки роста культуры (до 8 мм).

К группе штаммов со способностью незначительно подавлять рост других штаммов были отнесены:

- 1) *L. paracasei* 9SM – *L. fermentum* Ku-f и *L. plantarum* 7LV;
- 2) *L. plantarum* Dec 1 – *L. fermentum* Ku-f, *L. paracasei* Кыз 2, *L. paracasei* 15 Sul-c и *L. plantarum* 7LV;
- 3) *L. fermentum* 8 AM – *L. fermentum* Ku-f, *L. paracasei* Кыз 2, *L. paracasei* 15 Sul-c, *L. plantarum* 7LV и *L. fermentum* 10POD;
- 4) *L. fermentum* Ku-f – *L. paracasei* 9SM, *L. plantarum* Dec 1 и *L. fermentum* 8 AM;
- 5) *L. paracasei* Кыз 2 – *L. plantarum* Dec 1, *L. fermentum* 8 AM и *L. plantarum* 7LV;
- 6) *L. plantarum* 7LV – *L. plantarum* Dec 1, *L. fermentum* 8 AM, *L. fermentum* Ku-f, *L. paracasei* Кыз 2 и *L. paracasei* 15 Sul-c;
- 7) *L. fermentum* 10POD – *L. fermentum* 8 AM и *L. delbrueckii* 14 Ul-d;
- 8) *L. delbrueckii* 14 Ul-d – *L. fermentum* 10POD и *L. paracasei* 15 Sul-c;
- 9) *L. paracasei* 15 Sul-c – *L. plantarum* Dec 1, *L. fermentum* 8 AM, *L. plantarum* 7LV и *L. delbrueckii* 14 Ul-d.

Аутоштамм *L. fermentum* 12 Pet не показал никаких негативных влияний на другие штаммы.

Взаимоотношения биосовместимых лактобактерий относятся к синергидным, т.е. имеет место один из вариантов полезных межбактериальных взаимодействий: мутуализм, комменсализм или нейтрализм.

Полученные нами данные коррелируют с результатами других исследователей. Так, ранее было показано, что штаммы с наиболее слабым межвидовым антагонизмом относятся к виду *L. casei/paracasei*. Штаммы лактобацилл, относящиеся к виду *L. plantarum* и некоторые штаммы вида *L. acidophilus* также отнесены к группе со средней антагонистической активностью. Лактобактерии, относящиеся к видам *L. fermentum* и *L. delbrueckii* ранее не привлекали внимание исследователей в направлении исследования способности к сосуществованию (Соловьева и др., 2010).

Данные о межштаммовых взаимоотношениях микроорганизмов, полученные нами, позволили выделить группу бактерий рода *Lactobacillus*, наиболее перспективных в отношении совместного культивирования. Высокая степень биосовместимости этих штаммов показывает целесообразность их использования для совместного культивирования в составе мультиштаммовых пробиотиков.

3.8. Анализ биопленок, формируемых на инертных поверхностях аутоштаммами *Lactobacillus* spp.

В биопленках, клетки растут в многоклеточных агрегатах и заключены во внеклеточный матрикс, продуцируемый самими бактериями (Branda et al., 2005; Hall-Stoodley, Stoodley, 2009). Инфекционные заболевания часто связаны с образованием биопленок на слизистых и иных поверхностях в

организме человека, таких как, зубы, кожа и мочевыводящие пути (Hatt, Rather, 2008). Однако, образование биопленок у человека не всегда связано с инфекционными процессами, например, биопленки зубного налета насчитывают десятки видов и его состав часто определяет наличие или отсутствие болезни. В зубном налете происходит интенсивная колонизация и наличие некоторых полезных видов бактерий оказывает антагонистическое действие на патогенные микроорганизмы (Kreth, 2008). Такой же механизм действия *Lactobacillus* spp. и в кишечнике человека.

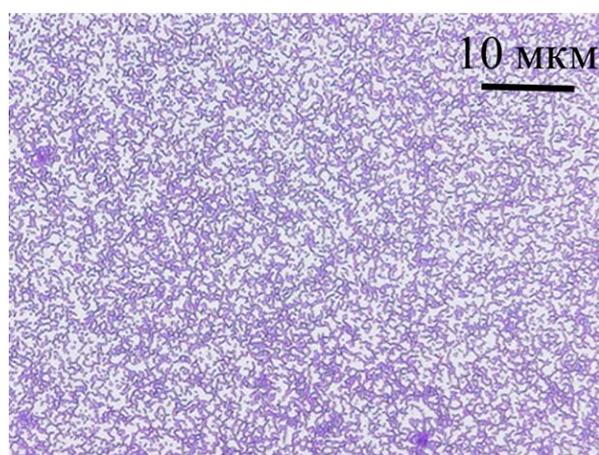


Рисунок 18 – Биопленки под микроскопом Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Germany)

Полученные нами аутоштаммы лактобактерий были изучены на биопленкообразование с помощью 48-луночных планшетов (таблица 13, рисунок 18, 19).

Таблица 13 – Относительная биомасса биопленок аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

аутоштаммы	3 сут	1 нед	2 нед
<i>Lactobacillus</i> spp.			
<i>L. paracasei</i> 9SM	0,276	0,305	0,372
<i>L. plantarum</i> Dec 1	0,329	0,445	0,456

<i>L. fermentum</i> 8 AM	0,287	0,319	0,451
<i>L. fermentum</i> 12 Pet	0,316	0,324	0,347
<i>L. fermentum</i> Ku-f	0,397	0,428	0,698
<i>L. paracasei</i> Kyz 2	0,360	0,384	0,504
<i>L. plantarum</i> 7LV	0,314	0,438	0,579
<i>L. fermentum</i> 10 POD	0,253	0,268	0,328
<i>L. delbrueckii</i> 14 Ul-d	0,295	0,309	0,412
<i>L. paracasei</i> 15 Sul-c	0,350	0,3541	0,468

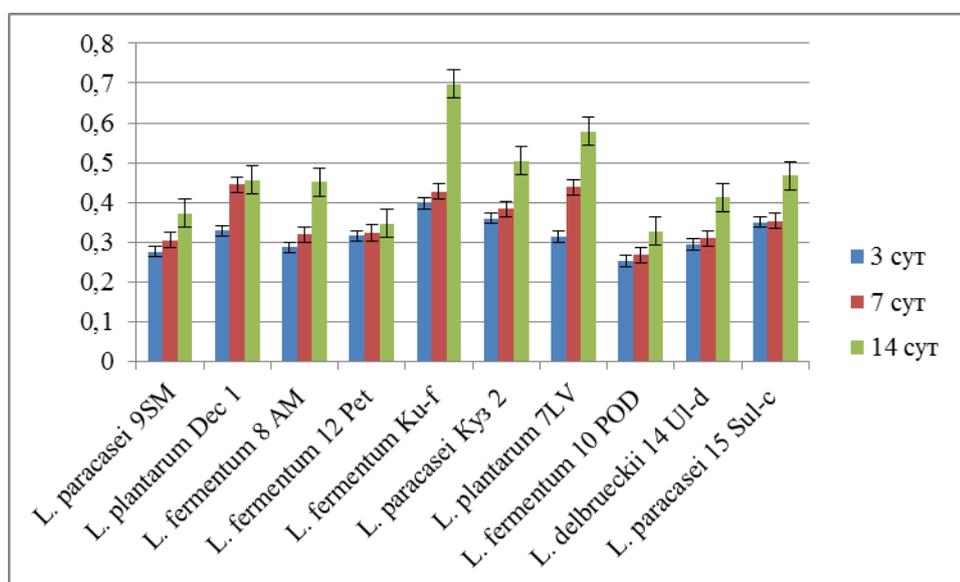


Рисунок 19 – Сравнение изменений в относительной биомассе биопленок аутоштаммов *Lactobacillus* spp. в 3-х периодах

Образование биопленок исследовалось в 3 периода, то есть оптическую плотность мерили через 3 сут, 7 дней и 2 недели (рисунок 19).

В мире много работ, где исследуют способность штаммов образовывать биопленки, изменения биопленок под воздействием каких-либо веществ, УПМ и т.п. Например, при исследовании тяжелого колита (частый побочный

эффект химиотерапии у онкологических больных) Qiu с соавт. (2023) попытались повысить жизнеспособность выделенных *L. rhamnosus* (LGG) в среде желудочного сока и облегчить колит, вызванный декстрансульфатом натрия (DSS) и доцетакселом. В результате LGG, вводимый натошак через желудочный зонд, значительно улучшал профилактический эффект колита, вызванного DSS и доцетакселом. LGG снижал проницаемость кишечника и экспрессию провоспалительных цитокинов, TNF α , IL-1 β и IL-6 при колите за счет образования биопленок. Увеличение дозы доцетаксела может уменьшить рост опухоли молочной железы и метастазирование в легкие, но не способствует выживаемости из-за тяжелого колита. Однако добавка LGG значительно улучшила выживаемость мышей с опухолями после лечения высокими дозами доцетаксела (Qiu, 2023).

В нашем исследовании все 10 аутоштаммов лактобактерий показали способность образовывать биопленки на инертных поверхностях. При измерении относительной оптической плотности через 3 дня наиболее высокую плотность показали штаммы *L. fermentum* Ku-f и *L. paracasei* Куз 2; через 7 дней – *L. plantarum* Dec 1 и *L. fermentum* Ku-f; через 2 недели самый высокий показатель у аутоштамма *L. fermentum* Ku-f, средний показатель у – *L. paracasei* Куз 2 и *L. plantarum* 7LV. В результате *L. fermentum* Ku-f показал самую высокую относительную плотность биопленок на полистироловых планшетах. Примечательно, что практически у всех аутоштаммов наибольший прирост относительной оптической плотности биопленок достигался между 7 и 14 сутками культивирования, то есть самая высокая концентрация бактерий в биопленках показывала через 2 недели. Данный факт дает основание полагать, что применение пробиотиков на основании исследуемых аутоштаммов в лечебных целях должно быть не меньше 10-14 дней для наибольшей эффективности.

3.9. Определение эмульгирующих свойств выделенных аутоштаммов

Биосурфактанты, являющиеся поверхностно активными веществами (ПАВ), которые образуются многими микроорганизмами, являясь вторичными метаболитами. Различные штаммы лактобактерий одного вида могут обладать разными антимикробными свойствами и механизмами их осуществления. Они способны синтезировать и экскретировать биосурфактанты, классические бактериоцины, бактериоцино-подобные вещества, белковые соединения, препятствующие адгезии патогенных бактерий и таксономически близких микроорганизмов. Например, поверхностно-активные компоненты из *L. acidophilus* и *L. fermentum* могут предотвращать образование биопленки на абиотических поверхностях (Velraeds et al., 1998) и адгезию *E. faecalis* на эпителии (Heinemann et al., 2000), соответственно. Таким образом, еще одним механизмом действия лактобактерий против патогенов связан с продукцией биосурфактанта, проявляющего антимикробные и антиадгезивные для патогенов свойства (Goma, 2013).

В пробирки вносили гексадекан и культуральную жидкость каждого из штаммов согласно методике. Содержимое пробирок перемешивали и анализировали спустя 24 ч (таблица 14, рисунок 20).

Таблица 14 – Средний индекс эмульгирования *Lactobacillus* spp.

№ п/п	Вид <i>Lactobacillus</i> spp.	Название штамма	Средний индекс эмульгирования
1	<i>L. paracasei</i>	9SM	14,3%
2	<i>L. plantarum</i>	Dec 1	8,6%

3	<i>L. fermentum</i>	12 Pet	15,7%
4	<i>L. fermentum</i>	Ku-f	42,8%
5	<i>L. delbrueckii</i>	14 Ul-d	22,8%
6	<i>L. paracasei</i>	15 Sul-c	14,3%
7	<i>L. fermentum</i>	10 POD	12,8%
8	<i>L. plantarum</i>	7LV	11,4%
9	<i>L. paracasei</i>	Kyz 2	17,1%
10	<i>L. fermentum</i>	8 AM	15,7%

В результате было показано, что атоштамм Ku-f показал наибольший средний индекс эмульгирования – 42,8 %, что заметно выше остальных. Средний индекс показал аутоштамм 14 Ul-d – 22,8 %.

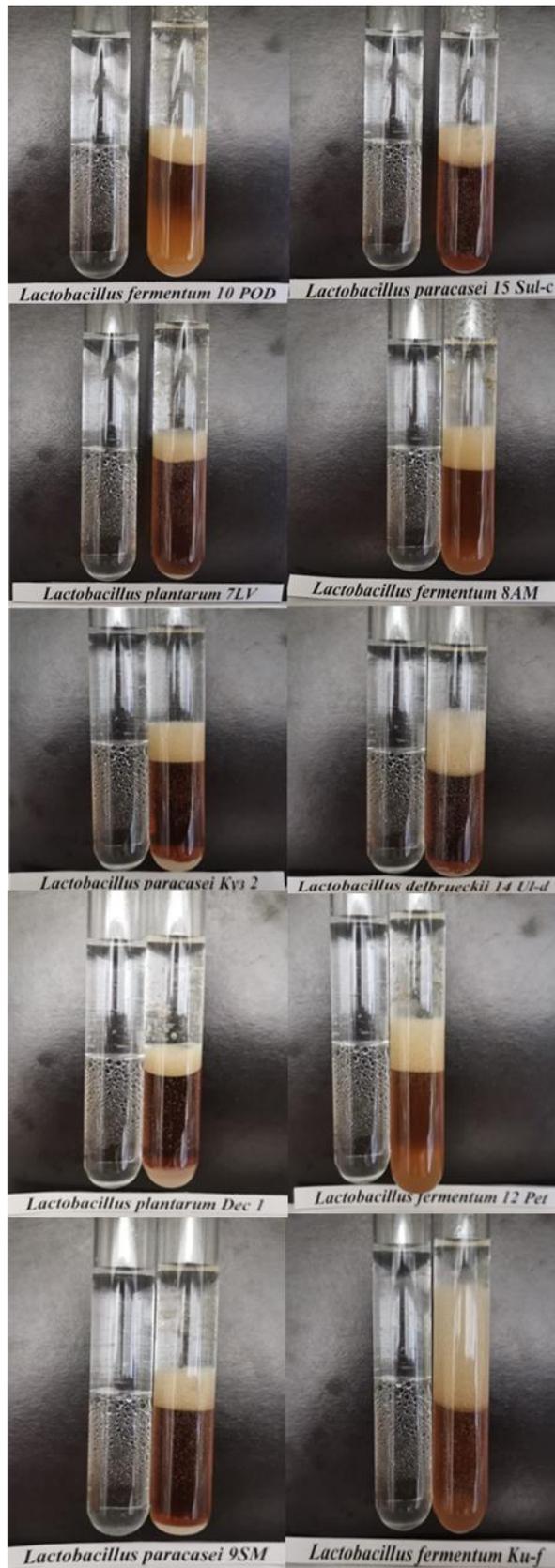


Рисунок 20 – Активность эмульгирования штаммов *Lactobacillus* spp.: 1-ая пробирка контроль – вода с гексадеканом, 2-ая пробирка – изучаемый штамм с гексадеканом

Исходя из выше полученных данных, атоштамм *L. fermentum* Ku-f показал один из самых лучших результатов. Так он обладал наилучшими ингибирующими *E. coli* и *S. aureus* способностями, также показал самую высокую относительную плотность биопленок на полистироловых планшетах.

Основные преимущества биосурфактантов по сравнению с синтетическими ПАВ – их низкая токсичность, практически полная биоразлагаемость, экологическая безопасность, высокая биосовместимость, возможность получения из дешевых и возобновляемых источников, разнообразие химической структуры и, как следствие, физико-химических свойств, термостабильность, кислотостойкость, способность растворять гидрофобные компоненты, низкие значения критической концентрации мицеллообразования и т. д. (Hořková et al., 2013; Poomtien et al., 2013; Souza et al., 2014; Varjani, Upasani, 2016; Varjani et al., 2017; Elshikh et al., 2017). При этом биосурфактанты имеют и ряд свойств, не характерных для синтетических ПАВ. Среди них, например, антибактериальная, антифунгицидная, антиадгезионная и антивирусная активность (Rodrigues et al., 2006; Vanat, 2019). Биосурфактанты имеют высокий потенциал и практическое значение во многих сферах деятельности человека: в нефтяной и добывающей промышленности, сельском хозяйстве, медицине, косметологии, пищевой промышленности, химическом производстве моющих и чистящих средств, текстильной промышленности и т. д. Поэтому в настоящее время ведется интенсивная работа в направлении поиска новых продуцентов биосурфактантов и новых свойств биосурфактантов, которые

позволят расширить спектр их применения (Рудакова и др., 2021). Следовательно, большой интерес представляют собой новые штаммы-продуценты биосурфактантов с набором полезных свойств для человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растущий интерес потребителя к укреплению здоровья и профилактике хронических заболеваний стимулирует развитие рынка фармацевтических препаратов, в частности развитие добавок, продуктов с пробиотическими штаммами. Данная работа направлена на изучение полезных свойств аутоштаммов, выделенных из кишечника пациентов с дисбиотическими состояниями для их дальнейшего применения в качестве пробиотика. Исследование позволило оценить способность штаммов *L. paracasei* 9SM, *L. plantarum* Dec 1, *L. fermentum* 8 AM, *L. fermentum* 12 Pet, *L. fermentum* Ku-f, *L. paracasei* Куз 2, *L. plantarum* 7LV, *L. fermentum* 10POD, *L. delbrueckii* 14 Ul-d и *L. paracasei* 15 Sul-c проявлять антимикробную активность по отношению к условным патогенам *E. coli* и *S. aureus*, что может быть обусловлено способностью штаммов к синтезу бактериоцинов, подавляющих жизнедеятельность микроорганизмов; оценить устойчивость штаммов к действию 20 антибиотиков, адгезивной способности к буккальным эпителиоцитам человека, способности образовывать биопленки, что способствует колонизации поверхности кишечника и т.п. Проведенные исследования доказали возможность использования отобранных десяти аутоштаммов в качестве пробиотиков. В дальнейших исследованиях планируется изучение пробиотических свойств консорциумов, составленных на основании данных о биосовместимости описанных штаммов.

Полученные аутоштаммы *Lactobacillus* spp. обладают высокой адгезионной способностью, кислотообразующей и антагонистической активностью и по результатам исследований могут быть определены как кандидаты для дальнейших исследований и создания эффективных новых

пробиотиков, также могут применяться в качестве вспомогательных препаратов для повышения эффективности лекарственной терапии и контроля заболеваний, вызываемых энтеропатогенными бактериями.

ВЫВОДЫ

1. Выделены 182 штамма *Lactobacillus* spp., которые с помощью микробиологических исследований и масс-спектрометрии были идентифицированы до видов: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. crispatus*.

2. Проведена молекулярно-генетическая идентификация с помощью секвенирования консервативного гена 16S рРНК наиболее перспективных десяти штаммов *Lactobacillus* spp.

3. Показаны биологические свойства наиболее эффективных и перспективных аутоштаммов *Lactobacillus* spp.: 9SM, Dec 1, 12 Pet, Ku-f, 14 Ul-d, 15 Sul-c, 10 POD, 7LV, Куз 2, 8AM.

4. У аутоштаммов *Lactobacillus* spp.: 9SM, Dec 1, Ku-f, 14 Ul-d, 15 Sul-c, 10 POD, 7LV, Куз 2, 8AM обнаружена межштаммовая бионесовместимость к другим исследуемым аутоштаммам, тогда как *L. fermentum* 12 Pet не показал никаких негативных влияний на другие штаммы.

5. Собрана коллекция аутоштаммов-кандидатов для дальнейшего их изучения и разработки пробиотиков и БАД на их основе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баженов Л.Г., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. и др. Изучение антагонистического действия лактобацилл на *Helicobacter pylori*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1997 № 3 С. 89–91.
2. Бойцов А.Г., Рищук С.В., Ильясов Ю.Ю., Гречанинова Т.А. Адгезия лактобактерий к клеткам вагинального и буккального эпителия. Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии им. И.И. Мечникова. 2004. 4 (5). 191-3.
3. Боровкова Е.А., Алиева Е.В., Ковалев Д.А. и др. Оценка безопасности индигенных лактобацилл кишечника, перспективных в качестве аутопробиотиков. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. 2020. № 7. С. 14–19.
4. Вершинина З. Р., Чубукова О. В., Никоноров Ю. М., Хакимова Л. Р., Лавина А. М., Каримова Л. Р., Баймиев Ан. Х., Баймиев А. Х. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum*. Микробиология. 2021. Т. 90. № 2. С. 191-203. doi: 10.31857/S0026365621020154
5. Головач Т.Н. Опыт совместного культивирования лактобацилл. Микробиологический журн. 2004. № 6. С. 23–25.
6. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. 1994.
7. Ермоленко Е.И., Ерофеев Н.П., Захарова Л.Б., Парийская Е.Н., Котылева М.П., Крамская Т.А., Карасева А.Б., Суворов А.Н. Особенности состава микробиоты и моторики кишечника после коррекции экспериментального дисбиоза пробиотическими и аутопробиотическими

энтерококками. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2017. № 7 (143). С. 89–96.

8. Зюбр Т.П., Мурашкина И.А., Васильев И.Б.. Препараты нормофлоры. Учебно-методическое пособие. 2008. ГОУ ВПО ИГМУ РОСЗДРАВА. 59 с.

9. Ильин В.К., Кирюхина Н.В. Синдром нарушения колонизационной резистентности человека в искусственной среде обитания и его профилактика. Acta Naturae. 2014; 6(2(21)): 11-20.

10. Попова-Борзашка С., Коршунов В.М., Тарабрина Н.П., Боссарт Б. Определение антагонистической активности лактобактерий *Solco (Lactobacillus acidophilus* Ldt 11/83) при использовании гнотобиологической технологии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1990. № 9. С. 3–6.

11. Рудакова М.А., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Биосурфактанты: современные тренды применения. Ученые записки казанского университета. Серия естественные науки. 2021, Т. 163. С. 177–208. doi: 10.26907/2542-064X.2021.2.177-208

12. Симаненков В.И., Бакулина Н.В., Тихонов С.В., Ермоленко Е.И., Декканова В.Д., Котылева М.П., Лавренова Н.С., Воропаева Л.С., Коржева М.Д., Суворов А.Н., Цапиева А.Н. Эффективность и безопасность аутопробиотической терапии у пациентов с сахарным диабетом второго типа, Медицинский алфавит. 2020. № 30. С. 48–53

13. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А., Белова И.В., Иванова Т.П., Соколова К.Я. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 462–468

14. Соловьева О.И., Симаненков В.И., Суворов А.Н., Ермоленко Е.И., Шумихина И.А., Свиридо Д.А. Использование пробиотиков и аутопробиотиков в лечении синдрома раздраженной толстой кишки.

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2017. № 7 (143). С. 115–120.

15. Суворов А. Н. Микробная персонифицированная терапия как новый инструмент лечащего врача // Российский журнал персонализированной медицины. 2022. Т. 2. № 1. С. 51-62.

16. Точилина А. Г., Белова, И. В., Соловьева, И. В., Новикова, Н. А., Иванова, Т. П., Жирнов, В. А. Изучение биологических свойств штаммов рода *Lactobacillus*. Современные проблемы науки и образования. 2015. (5). 631-631.

17. Червинец В.М., Миронов А.Ю., Червинец Ю.В., Базлов С.Н. Состояние и значение микробиоценозов пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки при язвенной болезни, хроническом гастрите, эзофагите. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65(1): 42-49.

18. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Леонтьева А.В., Козлова Е.А., Стулов Н.М., Беляев В.С., Григорьянц Э.О., Миронов А.Ю. Микробиом полости рта у больных парадонтитом, адгезивные и биопленкообразующие свойства. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66(1): 45-51.

19. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Чичановская Л.В., Ганзя Д.В., Григорьянц Э.О., Беляев В.С., Миронов А.Ю. Спектр газовых сигнальных молекул кишечных лактобацилл у больных ишемическим инсультом. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67(3).

20. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Тверь. 2016. Центр Твер.гос.мед.ун-та. 214 с.

21. Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. Филогения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосферы бобовых растений Южного Урала. Микробиология. 2022. Т. 91. № 5. С.

22. Шендеров Б.А. Роль персонального функционального питания в современных программах медицины антистарения. Вестник восстановительной медицины. 2009; 3 (31): 9-17.
23. Alkanani A.K., Hara N., Gottlieb P.A., Ir D., Robertson C.E., Wagner B.D., Frank D.N., Zipris D. Alterations in intestinal microbiota correlate with susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015; 64:3510–3520.
24. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. 1995. *Microbiol Rev* 59, 143–169.
25. Asemi Z., Jazayeri S., Najafi M., et al. Effects of daily consumption of probiotic yoghurt on inflammatory factors in pregnant women: a randomized controlled trial. 2011. *Pak J Biol Sci* 14, 476–482.
26. Asemi Z., Jazayeri S., Najafi M., et al. Effect of daily consumption of probiotic yoghurt on oxidative stress in pregnant women: a randomized controlled clinical trial. 2012. *Ann Nutr Metab* 60, 62–68.
27. Audisio M.C., Beni'tez-Ahrendts M.R. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. 2011. *Benef Microbes* 2, 29–34.
28. Banat I.M., Thavasi R. (Eds.) *Microbial Biosurfactants and Their Environmental and Industrial Applications*. – Boca Raton, Fla.: CRC Press. 2019. – 372 p.
29. Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S.M.H., Sharifi S., Memar M.Y., Vahed S.Z. The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms. *Infect. Drug Resistance*. 2020; 13: 659–72.
30. Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S.M.H., Sharifi S., Memar M.Y., Vahed S.Z. The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms. *Infect. Drug Resistance*. 2020; 13: 659–72.

31. Bäumler A.J., Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016; 535(7610):85–93.
32. Beerens H. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. 1990. *Lett Appl Microbiol* 11, 155–157.
33. Bonfili L., Cecarini V., Gogoi O., Gong C., Cuccioloni M., Angeletti M., Giacomo Rossi Eleuteri A. M. Microbiota modulation as preventative and therapeutic approach in Alzheimer’s disease. *FEBS J*. 2021; 288: 2836–55.
34. Bonfili L, Cecarini V., Gogoi O., Gong C., Cuccioloni M., Angeletti M., Giacomo Rossi Eleuteri A. M. Microbiota modulation as preventative and therapeutic approach in Alzheimer’s disease. *FEBS J*. 2021; 288: 2836–55.
35. Borisov L.B. *Medical Microbiology, Virology, Immunology*. Moscow: MIA; 2002.
36. Branda S. S., Vik Å., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*. 2005. 13(1), 20-26.
37. Buffington S.A., Di Prisco G.V., Auchtung T.A., Ajami N.J., Petrosino J.F., Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*. 2016; 165:1762–1775.
38. Candela M., Perna F., Carnevali P., et al Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. 2008. *Int J Food Microbiol* 31, 286–292.
39. Chen J., Chia N., Kalari K.R., Yao J.Z., Novotna M., Soldan M.M.P., Luckey D.H., Marietta E.V., Jeraldo P.R., Chen X., et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep*. 2016; 6:1–10.

40. Chenoll E., Casinos B., Bataller E., et al. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. 2011. *Appl Environ Microbiol* 77, 1335–1343.
41. Cho I.L., Lee N.K., Hahm Y.T. Characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of breast-feeding piglets. 2009. *J Biosci Bioeng* 108, 194–198.
42. Chu D.M., Ma J., Prince A.L., Antony K.M., Seferovic M.D., Aagaard K.M. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat. Med.* 2017; 23:314–323.
43. Chu H., Kang S., Ha S., et al. *Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol.* 2005. 49. 941–948.
44. Chu W., Lu F., Zhu W., et al. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorumsensing system. *J Appl Microbiol.* 2011. 110, 202–208.
45. Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* 2007; 45: 454-60.
46. Collado M.C., Gueimonde M., Salminen S. Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. *Bioactive Foods Promot Health.* 2010. 23, 353–370.
47. Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol.* 2007. 45, 454–460.
48. d’Ettorre G., Rossi G., Scagnolari C., Andreotti M., Giustini N., Serafino S., Schietroma I., Scheri G.C., Fard S.N., Trinchieri V., et al. Probiotic

supplementation promotes a reduction in T-cell activation, an increase in Th17 frequencies, and a recovery of intestinal epithelium integrity and mitochondrial morphology in ART-treated HIV-1-positive patients. *Immunity, Inflamm. Dis.* 2017; doi: 10.1002/iid3.160

49. Dave R.I., Shah N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *bifidobacteria*. *J Dairy Sci.* 1995. 79, 1529–1536.

50. de Goffau M.C., Fuentes S., Van Den Bogert B., Honkanen H., De Vos W.M., Welling G.W., Hyöty H., Harmsen H.J.M. Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. *Diabetologia.* 2014; 57:1569–1577.

51. de los Reyes-Gavilán C.G., Suárez A., Fernández-García M., et al. Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res Microbiol.* 2011. 162, 514–519.

52. Donlan R. M. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Bacterial biofilms.* 2008. 133-161.

53. Drissi F., Raoult D., Merhej V. Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microb. Pathog.* 2016.

54. Duar R.M., Frese S.A., Fernando S.C., Burkey T.E., Tasseva G., Peterson D.A., Blom J., Wenzel C.Q., Szymanski C.M., Walter J. Experimental determination of host adaptation of *Lactobacillus reuteri* to different vertebrate species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83:1–44.

55. Elshikh M., Moya-Ramírez I., Moens H., Roelants S., Soetaert W., Marchant R., Banat I.M. Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: Natural antimicrobial surfactants for oral hygiene . *J. Appl. Microbiol.* 2017. 123, 5. P. 1111–1123.

56. Fan P., Liu P., Song P., Chen X., Ma X. Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Sci. Rep.* 2017; 7:1–12.
57. Fang H., Fu L., Wang J. Protocol for Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2018 Sep 13; 2018: 8941340.
58. Fehe' r T., Burland V., Po'sfai G. In the fast lane: largescale bacterial genome engineering. *J Biotechnol.* 2012. 160, 72–79.
59. Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Mu'noz-Quezada S., Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition.* 2013; 109(S2): S35-S50.
60. Ford A.C., Quigley E.M.M., Lacy B.E., Lembo A.J., Saito Y.A., Schiller L.R., Soffer E.E., Spiegel B.M.R., Moayyedi P. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 2014; 109:1547–1561.
61. Frick J.S., Schenk K., Quitadamo M., et al. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2007. 13, 83–90.
62. Ganji-Arjenaki M., Rafieian-Kopaei M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta-analysis and systematic review. *J Cell Physiol.* 2017; doi: 10.1002/jcp.25911
63. Goldstein E. J. C., Tyrrell K. L., Citron D. M. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases.* 2015; 60(2): 98–S107.
64. Golowczyc M.A., Mobili P., Garrote G.L., et al. Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Int J Food Microbiol.* 2007. 118, 264–273.

65. Golubeva A.V., Crampton S., Desbonnet L., Edge D., O'Sullivan O., Lomasney K.W., Zhdanov A.V., Crispie F., Moloney R.D., Borre Y.E., et al. Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*. 2015; 60:58–74.
66. Gomaa E.Z. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol*. 2013; 59(6):425–436.
67. Gonzalez F.J., Jiang C., Patterson A.D. An intestinal microbiota-farnesoid X receptor axis modulates metabolic disease. *Gastroenterology*. 2016; 151:845–859.
68. Gopal P.K., Prasad J., Smart J., et al. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*. 2001. 67, 207–216.
69. Gosmann C, Anahtar MN, Handley SA, Farcasanu M, Abu-Ali G, Bowman BA, Padavattan N, Desai C, Droit L, Moodley A, et al. Lactobacillus-deficient cervicovaginal bacterial communities are associated with increased HIV acquisition in young South African women. *Immunity*. 2017; 46:29–37.
70. Gou H.-Z., Zhang Y.-L., Ren L.-F., Li Z.-J., Zhang L. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Front. Microbiol*. 2022; 13: 929346.
71. Goubeyre P., Denery S., Bodinier M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol* 2011. 89, 685–695.
72. Guarner F., Malagelada J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003. 361, 512–519.

73. Gueimonde M., Sanchez B. G., de Los Reyes-Gavilán C., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.* 2013; 4:202.
74. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology.* 2009. 11(7), 1034-1043.
75. Haller D., Colbus H., Ganzle M.G., et al. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst Appl Microbiol.* 2001. 24, 218–226.
76. Heeney D.D., Gareau M.G., Marco M.L. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr Opin Biotechnol.* 2018; 49: 140–147.
77. Heinemann L., Linkeschova R., Rave K., Hompesch B., Sedlak M. A. R. T., Heise T. Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo. *Diabetes care.* 2000. 23(5), 644-649.
78. Hill J.E., Baiano J.C., Barnes A.C. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J Fish Dis.* 2009. 32, 1007–1016.
79. Hill J.E., Baiano J.C., Barnes A.C. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J Fish Dis.* 2009. 32, 1007–1016.
80. Hirao L.A., Grishina I., Bourry O., Hu W.K., Somrit M., Sankaran-Walters S., Gaulke C.A., Fenton A.N., Li J.A., Crawford R.W., et al. Early mucosal sensing of SIV infection by paneth cells induces IL-1 β production and initiates gut epithelial disruption. *PLoS Pathog.* 2014; 10:1–15.
81. Hošková M., Schreiberová O., Ježdík R., Chudoba J., Masák J., Sigler K., Řezanka T. Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic

Acinetobacter and Enterobacter bacteria. *Bioresour. Technol.* 2013. 130. 510–516.

82. Hu J., Wang C., Ye L., Yang W., Huang H., Meng F., Ding, Z. Shaohua Shi. Anti-tumour immune effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* to CT26 tumour-bearing mice. *J. Biosci.* 2015; 40: 269–79.

83. Hu J., Wang C., Ye L., Yang W., Huang H., Meng F., Ding, Z. Shaohua Shi. Anti-tumour immune effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* to CT26 tumour-bearing mice. *J. Biosci.* 2015; 40: 269–79.

84. Ince G., Gursoy H., Ipci S. D., Cakar G., Emekli-Alturfan E., Yilmaz S. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus Reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *J. Periodontol.* 2015; 86: 746–754.

85. Izquierdo E., Medina M., Ennahar S., et al. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr Microbiol.* 2008. 56, 613–618.

86. Jamal M., Ahmad W, Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A., Hussain T., Ali, M., Rafiq M., Kamil M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018; 81: 7–11.

87. Jankowska A., Laubitz D., Antushevich H., et al. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol* 2008, 357964.

88. Kahouli I., Malhotra M., Westfall S., Alaoui-Jamali M. A., Prakash, S. Design and validation of an orally administrated active *L. fermentum*-*L. acidophilus* probiotic formulation using colorectal cancer Apc Min/+ mouse model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 101: 1999–2019.

89. Karska-Wysocki B., Bazo M. Smoragiewicz W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol Res.* 2010. 165, 674–686.
90. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides.* 2004. V. 25. N 9. P. 1405–1414.
91. Kouchaki E., Tamtaji O.R., Salami M., Bahmani F., Daneshvar Kakhaki R., Akbari E., Tajabadi-Ebrahimi M., Jafari P., Asemi Z. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with multiple sclerosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Nutr.* 2016.
92. Kreth J., Zhang Y., Herzberg M. C. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology.* 2008. 190(13), 4632-4640.
93. Laparra J.M., Sanz Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 49: 695-701.
94. Laparra J.M., Sanz Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol.* 2009. 49, 695–701
95. Leblond-Bourget N., Philippe H., Mangin I., et al. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter-and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int J Syst Bacteriol.* 1996. 46, 102–111.
96. Leclercq S., Mian F.M., Stanisz A.M., Bindels L.B., Cambier E., Ben-Amram H., Koren O., Forsythe P., Bienenstock J. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat. Commun.* 2017; 8:1–12.
97. Lenaerts K., Bouwman F.G., Lamers W.H., et al. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics.* 2007. 8, 91.

98. Lewis J.D., Chen E.Z., Baldassano R.N., Otley A.R., Griffiths A.M., Lee D., Bittinger K., Bailey A., Friedman E.S., Hoffmann C, et al. Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2015; 18:489–500.
99. Li D., Chen H., Mao B., Yang Q., Zhao J., Gu Z., Zhang H., Chen Y.Q., Chen W. Microbial biogeography and core microbiota of the rat digestive tract. *Sci. Rep.* 2017; 7:1–16.
100. Lim C.K., Bilgin A., Lovejoy D.B., Tan V., Bustamante S., Taylor B.V., Bessede A., Brew B.J., Guillemin G.J. Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci. Rep.* 2017; 7:1–9.
101. Lin P.P., Hsieh Y.M., Tsai C.C. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* RY2 isolated from healthy infancy feces on the growth and adhesion characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Anaerobe*. 2009. 15, 122–126.
102. Liong M. T. (ed.). Probiotics: biology, genetics and health aspects. Springer Science & Business Media, 2011. T. 21.
103. Liu H-N., Wu H., Chen Y-Z., Chen Y-J., Shen X-Z., Liu T-T. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver Dis.* 2017; 49:331–337.
104. Liu X., Zeng B., Zhang J., Li W., Mou F., Wang H., Zou Q., Zhong B., Wu L., Wei H., et al. Role of the gut microbiome in modulating arthritis progression in mice. *Sci. Rep.* 2016; 6:1–11.
105. Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, et al. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int J Mol Sci.* 2009. 10, 3755–3775.

106. Mathipa M.G., Thantsha M.S. Probiotic engineering: Towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *GutPathog.* 2017; 9: 28. DOI: 10.1186/s13099-017-0178-9
107. Moayyedi P., Ford A.C., Talley N.J., et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut.* 2010. 59, 325–332.
108. Mohan M., Chow C.E.T., Ryan C.N., Chan L.S., Dufour J., Aye P.P., Blanchard J., Moehs C.P., Sestak K. Dietary gluten-induced gut dysbiosis is accompanied by selective upregulation of microRNAs with intestinal tight junction and bacteria-binding motifs in rhesus macaque model of celiac disease. *Nutrients.* 2016; 8:1–18.
109. Morikawa M., Tsujibe S., Kiyoshima-Shibata J., Watanabe Y., Kato-Nagaoka N, Shida K, Matsumoto S. Microbiota of the small intestine is selectively engulfed by phagocytes of the lamina propria and Peyer's patches. *PLoS One.* 2016; 11:1–16.
110. Muñoz J.A., Chenoll E., Casinos B., et al. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections." *Applied and environmental microbiology.* 2011. 77.24 (2011): 8775-8783.
111. Naidoo K., Gordon M., Fagbemi A.O., et al. Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* issue. 2011. 12, CD007443.
112. Nistal E., Caminero A., Herran A.R., Perez-Andres J., Vivas S., Ruiz De Morales J.M., Saenz de Miera L.E., Casqueiro J. Study of duodenal bacterial communities by 16S rRNA gene analysis in adults with active celiac disease vs non-celiac disease controls. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 120:1691–1700.

113. Ohland C.L., Macnaughton W.K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010. 298, G807–G819.
114. Ohshima T., Kojima Y., Seneviratne C. J., Maeda N. Therapeutic Application of Synbiotics, a Fusion of Probiotics and Prebiotics, and Biogenics as a New Concept for Oral Candida Infections: A Mini Review. *Front. Microbiol*. 2016; 7: 10.
115. Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. 82, 279–289.
116. Pamer E.G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*. 2016; 352(6285): 535–8.
117. Pe´rez-Sa´nchez T., Balca´zar J.L., Garc´ıa Y., et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis*. 2011. 34, 499–507.
118. Pelletier X., Laure-Boussuge S., Donazzolo Y. Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactoseintolerant male subjects: importance of the live flora. *Eur J Clin Nutr*. 2001. 55, 509–512.
119. Petrof E.O. Probiotics and gastrointestinal disease: clinical evidence and basic science. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2009. 8; 260–269.
120. Pillai A., Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* issue. 2008. 1, CD004611.
121. Qiu X., Han X., Zhang X., Teng L. A., Sriwastva M. K., Zhen, L., Wang, S. *Lactobacillus rhamnosus* GG alleviates colitis caused by chemotherapy via biofilm formation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2023.

122. Quadri L.E. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002. V. 82(1–4). P. 133–145.
123. Rafter J., Bennett M., Caderni G., et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr*. 2007. 85, 488–496.
124. Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol*. 2010. 27, 1–11.
125. Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: Potential applications in medicine // *J. Antimicrob. Chemother*. 2006. V. 57, No 4. P. 609–618. doi:10.1093/jac/dkl024.
126. Rogosa M., Mitchell J.A., Wiseman R.F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J Bacteriol*. 1951. 62, 132–133
127. Rossi M., Martinez-Martinez D., Amaretti A., Ulrici A., Raimondi S., Moya A. Mining metagenomic whole genome sequences revealed subdominant but constant *Lactobacillus* population in the human gut microbiota. *Environ. Microbiol. Rep*. 2016; 8:399–406.
128. Rothhammer V., Mascanfroni I., Bunse L., Takenaka M., Kenison J., Mayo L., Chao C-C., Patel B., Yan R., Blain M., et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat. Med*. 2016; 22:586–597.
129. Roy CILe, Štšepetova J., Sepp E., Songisepp E., Sandrine P., Mikelsaar M. New insights into the impact of *Lactobacillus* population on host-bacteria metabolic interplay. *Oncotarget*. 2015; 6:30545–30556.

130. Ryan K.A., Jayaraman T., Daly P., et al. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Lett Appl Microbiol.* 2008. 47, 269–274.
131. Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005. 21, 1–26
132. Sanders M.E., Akkermans L.M., Haller D., et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 2010. 1, 164–185.
133. Silvi S., Rumney C.J., Rowland I.R. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J Appl Bacteriol.* 1996. 81, 561–564.
134. Sivamaruthi B. S., Kesika P., Chaiyasut C. A Review of the Role of Probiotic Supplementation in Dental Caries. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2020; 12: 1300–1309.
135. Slifierz M.J., Friendship R.M., Weese J.S. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *BMC Microbiol.* 2015; 15:1–12.
136. Souza E.C., Vessoni-Penna T.C., de Souza Oliveira R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014. V. 89. P. 88–94.
137. Srutkova´ D., Spanova A., Spano M., et al. Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *J Microbiol Methods* 2011. 87, 10–16.
138. Stanisavljević S., Lukić J., Soković S., Mihajlović S., Stojković M.M., Miljković D., Golić N. Correlation of gut microbiota composition with resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1–12.

139. Suvorov A., Karaseva A., Kotyleva M., et al. Autoprobiotics as an Approach for Restoration of Personalized Microbiota. *Front Microbiol.* 2018; :1869. Published 2018 Sep 12.
140. Tien M.T., Girardin S.E., Regnault B., et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2006. 176, 1228–1237.
141. Tsai C.C., Lin P.P., Hsieh Y.M. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. *Anaerobe.* 2008. 14, 61–67.
142. Uusitalo U., Liu X., Yang J., Hummel S., Butterworth M., Rewers M., Hagopian W., She J., Simell O., Toppari J., et al. Association of early exposure of probiotics and islet autoimmunity in the TEDDY study. *JAMA Pediatr.* 2016; 170:20–28.
143. Vaghef-Mehrabany E., Alipour B., Homayouni-Rad A., Sharif S-K., Asghari-Jafarabadi M., Zavvari S. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition.* 2014; 30:430–435.
144. Varjani S., Upasani V. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 2016. 221. P. 510–516.
145. Varma P., Dinesh K.R., Menon K.K., et al. *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *J Food Sci.* 2010. 75, M546–M551.
146. Vasiee A., Falah F., Mortazavi S.A. Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from Zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. *J. Appl. Microbiol.* 2022; 133: 3201–3214.

147. Velraeds M. M. C., Velraeds M. M., Van de Belt-Gritter B., Van der Mei H. C., Reid G., Busscher H. J. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant //Journal of Medical Microbiology. 1998. 47.12. 1081-1085.
148. Vujkovic-Cvijin I., Swainson L.A., Chu S.N., Ortiz A.M., Santee C.A., Petriello A., Dunham R.M., Fadrosch D.W., Lin D.L., Faruqi A.A., et al. Gut-resident *Lactobacillus* abundance associates with IDO1 inhibition and Th17 dynamics in SIV-infected macaques. *Cell Rep.* 2015; 13:1589–1597.
149. Wang H., Yan Y., Wang J., et al. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS One.* 2012. 7, e29452.
150. Wang P., Chen S., Liao C., Jia Y., Li J., Shang K., Chen J., Cao P., Li W., Li Y., Yu Z., Ding K. Probiotic Properties of Chicken-Derived Highly Adherent Lactic Acid Bacteria and Inhibition of Enteropathogenic Bacteria in Caco-2 Cells. *Microorganisms.* 2022; 10(12): 2515.
151. Williams NT (2010) Probiotics. *Am J Health Syst Pharm* 67, 449–458.
152. Winker S., Woese C.R. A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst Appl Microbiol* 1991. 14, 305–310.
153. Woodard GA, Encarnacion B, Downey JR, et al. (2009) Probiotics improve outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective randomized trial. *J Gastrointest Surg* 13, 1198–1204.
154. Yan F., Polk D.B. Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011. 27, 496–501.
155. Yang L., Poles M.A., Fisch G.S., Ma Y., Nossa C., Phelan J.A., Pei Z. HIV-induced immunosuppression is associated with colonization of the proximal gut by environmental bacteria. *AIDS.* 2016; 30:19–29.

156. Yoo J. I., Shin I. S., Jeon J. G., Yang Y. M., Kim J. G., Lee D. W. The Effect of Probiotics on Halitosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2019; 11: 150–157.
157. Yoo J.I., Shin I.S., Jeon J.G., Yang Y.M., Kim J.G., Lee D.W. The effect of probiotics on halitosis: a systematic review and meta-analysis. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2019; 11: 150-7.
158. Zamani B., Golkar H.R., Farshbar S., Emadi-Baygi M., Tajabadi-Ebrahimi M., Jafari P., Akhavan R., Taghizadeh M., Memarzadeh M.R., Asemi Z. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int. J. Rheum. Dis*. 2016; 19:869–879.
159. Zhang L., Xie C., Nichols R.G., Chan S.J., Jiang C., Hao R., Smith P.B., Cai J., Simons M.N., Hatzakis E., et al. Farnesoid X receptor signaling shapes the gut microbiota and controls hepatic lipid metabolism. *mSystems*. 2016; 1:1–17.
160. Zhang X., Zhang D., Jia H., Feng Q., Wang D., Liang D., Wu X., Li J., Tang L., Li Y., et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med*. 2015; 21:895–905.
161. Zhang Y., Ding Y., Guo Q. Probiotic Species in the Management of Periodontal Diseases: An Overview. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 806463.
162. Zhang Y., Ding Y., Guo Q. Probiotic species in the management of periodontal diseases: an overview. *Front Cell Infect. Microbiol*. 2022; 12: 806463. DOI:10.3389/fcimb.2022.806463.
163. Zijlmans M.A.C., Korpela K., Riksen-Walraven J.M., de Vos W.M., de Weerth C. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology*. 2015; 53:233–245.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	121
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
1.1.Микробиота ЖКТ	124
1.2. Нормобиоценоз и дисбактериоз ЖКТ	126
1.2.1. Понятие нормобиоценоза и дисбактериоза.....	126
1.2.2. Определение микробиоты кишечника.....	131
1.3. Систематика, морфология, физиология и экология бифидобактерий	132
1.3.1. Тип дыхания бифидобактерий.....	135
1.3.2. Местообитание	136
1.3.3. Биологические свойства бифидобактерий.	136
1.3.4. Функции и влияние бифидобактерий на человека при различных заболеваниях.....	139
1.4. Биосурфактанты.	142
1.5. Биопленки.....	145
1.6. Профилактика и лечение дисбактериоза желудочно-кишечного тракта.	147
1.7. Аутопробиотики из нормофлоры кишечника человека.....	152
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	157
2.1. Методика бактериологического исследования кала на дисбактериоз.	157
2.2. Выделение чистой культуры бифидобактерий.....	160
2.3. Методика идентификации на масс-спектрометре (MALDI-TOF)	162
2.4. Методика хранения культур Bifidobacterium spp.	163
2.5. Хранение выделенных культур Bifidobacterium spp.....	163

2.6. Методика определения кислотообразующей активности по Тернеру.....	163
2.7. Методика определения антагонистической активности штаммов бактерий.....	165
2.8. Методика определения антибиотикочувствительности бифидобактерий.	166
2.9. Методика определения эмульгирующей активности штаммов бифидобактерий.	166
2.10 Методика определения интенсивности пленкообразования методом связывания красителя.....	167
2.11. Методика определения адгезивной способности бифидобактерий.	169
2.12. Методика определения биосовместимости аутоштаммов бифидобактерий между собой.....	170
Глава3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	172
3.1. Технологии получения биомассы штаммов бифидобактерий	172
3.1.1. Работа с маточной культурой производственных штаммов бифидобактерий	172
3.1.2. Хранение маточной культуры	173
3.1.3. Культивирование производственных штаммов бифидобактерий .	173
3.1.4. Культивирование бифидобактерий в реакторах объемом.....	174
200 литров.....	174
3.2. Изучение физиологической активности производственной биомассы бифидобактерий, полученной при жидкостном культивировании в реакторе	175
3.2.1. Изучение антагонистической активности в отношении условно-патогенных микроорганизмов	175
3.2.2. Изучение кислотообразующей активности биомассы штаммов бифидобактерий по Тернеру.....	176

3.2.3. Определение эмульгирующей активности биомассы промышленных штаммов бифидобактерий	177
3.2.4. Изучение стабильности титров КОЕ и физиологической активности производственной биомассы штаммов бифидобактерий	179
3.3. Изучение свойств БАДа, полученного на основе биомассы штамма бифидобактерий <i>B. animalis</i> AC 1248.	180
3.4.Изучение аутоштаммов бактерий рода <i>Bifidobacterium</i>	182
3.4.1. Изучение возможности выделения, размножения, сохранения и изучения свойств аутоштаммов <i>Bifidobacterium</i> spp.....	182
3.4.2. Идентификация <i>Bifidobacterium</i> spp.	183
3.4.3. Культурально-морфологические свойства аутоштаммов <i>Bifidobacterium</i> spp.	184
3.4.4. Определение антагонистической и кислотообразующей активности выделенных аутоштаммов	185
3.4.5. Определение способности адгезии к буккальному эпителию щеки человека.	190
3.4.6. Определение антибиотикочувствительности аутоштаммов <i>Bifidobacterium</i> spp.....	192
3.4.7. Определение способности к биопленкообразованию на инертных носителях.	194
3.4.8. Определение биосовместимости выделенных аутоштаммов <i>Bifidobacterium</i> spp. между собой.....	196
3.4.9. Определение эмульгирующей активности аутоштаммов бифидобактерий.	198
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	201
ВЫВОДЫ.....	203
Список использованной литературы.....	204

Список сокращений и условных обозначений

РАН – Российская академия наук

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

СИБР – синдром избыточного бактериального роста

РАМН – Российская академия медицинских наук

УПМ – условно-патогенные микроорганизмы

НАДН – Никотинамидадениндинуклеотид — кофермент, имеющийся во всех живых клетках

НИИ – научно-исследовательский институт

МПАВ – микробные поверхностно-активные вещества

ПАВ – поверхностно-активные вещества

MALDI–TOF MS – матрично-активированная, автоматическая лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Микрофлора желудочно-кишечного тракта человека, и в первую очередь толстого кишечника, на протяжении многих лет привлекает внимание исследователей из-за своего выраженного влияния на гомеостаз человеческого организма (O'Hara A.M. и др., 2006). Наиболее важной ролью микрофлоры является создание колонизационной резистентности, предотвращающей заселение кишечника патогенными микроорганизмами за счет синтеза веществ, подавляющих их рост, а также конкуренции за питательные вещества и места для адгезии (Thomas V.E. и др., 2002). Желудочно-кишечный тракт человека представляет собой комплексную экосистему. В норме в кишечнике преобладают бактероиды, молочнокислая микробиота (бифидобактерии и лактобактерии), анаэробные стрептококки, кишечная палочка, энтерококки и другие микроорганизмы (Пиксасова О.В., 2009). Концентрация микроорганизмов в толстом кишечнике человека достигает 10^{11} - 10^{12} . Одни из самых важных представителей полезной микрофлоры – бифидобактерии. Вырабатывая молочную и уксусную кислоту, они препятствуют размножению патогенных микроорганизмов. Бифидобактерии стимулируют перистальтику кишечника, повышают иммунитет организма, разлагают некоторые канцерогены и вырабатывают витамины.

Исследования последних лет указывают на дефицит бифидофлоры и снижение ее видового разнообразия у детей раннего возраста, признанных клинически здоровыми. Изменение видового состава бифидофлоры также стало характерным явлением последних двух десятилетий (Гончарова Г.И., 1986; Шкоропов А.Н. и др., 2007). Для коррекции и восстановления численности и качественного состава кишечной микробиоты, особое место занимают пробиотики – живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения

благоприятные эффекты на физиологические функции, биохимические и поведенческие реакции организма через оптимизацию его микробиоты. (Арданская, 2006).

Цель работы: Выделить аутоштаммы бифидобактерий из кишечника человека, изучить их биологические свойства для создания пробиотических препаратов.

Задачи:

- 1) Разработать технологию получения биомассы промышленных штаммов бифидобактерий;
- 2) Изучить физиологическую активность производственной биомассы бифидобактерий, полученной при жидкостном культивировании в реакторе;
- 3) Выделить чистую культуру и идентифицировать аутоштаммы бифидобактерий из кишечника человека методом масс-спектрометрии;
- 4) Изучить биологические свойства аутоштаммов бифидобактерий;
- 5) Анализ полученных данных и сбор коллекции наиболее перспективных аутоштаммов для создания пробиотических препаратов.

Научная новизна и теоретическая ценность. Проведен подбор оптимальных условий, разработана технология культивирования бифидобактерий на жидкой питательной, полусинтетической среде. Отработана технология работы с маточной культурой штаммов бифидобактерий. Отобраны критерии качества зрелой биомассы, условия хранения, стабильность полученной биомассы. Отработана технология выделения аутоштаммов из биоматериала, включающая метод накопления бифидобактерий в биоматериале. Выбраны условия хранения маточных культур в течении года.

Научно-практическая значимость. Полученные аутоштаммы *Bifidobacterium* spp. обладают высокой адгезионной способностью, кислотообразующей и антагонистической активностью и могут быть определены как кандидаты для дальнейших исследований и создания эффективных новых пробиотиков. Они могут применяться в качестве вспомогательных препаратов для повышения эффективности лекарственной терапии и контроля различных заболеваний.

Апробация результатов. Участие во Всероссийской конференции с международным участием «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства», 30 ноября -1 декабря 2022, г. Уфа

Публикации:

Потапова С.М., **Минлигареева Е.В.**, Чубукова О.В., Гимранова И.А., Хакимова Л.Р. Исследование биопленкообразования у бактерий *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. / Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН. 2022. С. 38-39.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микробиота ЖКТ

Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) насчитывает более 600 видов, выполняя большую роль в сохранении и поддержании здоровья человека (Малов В.А. и др.,2007). Микроорганизмы, входящие в состав микробиоты человека, находятся в постоянном том или ином виде взаимоотношения (нейтрализм, симбиоз, паразитизм и др.). Увеличение или уменьшение количества микроорганизмов или их метаболитов служит сигналом для активации адаптивных механизмов в экосистеме. Благодаря взаимосвязи микроорганизмов между собой, микроэкологическая система человека выступает как единое целое, слаженно работающий «завод». Изучение и знание изменений микробиоценоза кишечника позволит подойти к терапии основных заболеваний и коррекции микробиоценозов с патогенетической позиции (Харитонов Л.А. и др.,2007).

Численность микроорганизмов, населяющих различные отделы человеческого организма, примерно, 10^{15} , т.е. число микробных клеток на 2 порядка превышает численность клеток самого организма. Более 60% микрофлоры организма человека заселяет отделы желудочно-кишечного тракта. 15-16% микроорганизмов приходится на ротоглотку. 9% на урогенитальный тракт, кроме вагинального. Вагинальный тракт заселен на 2%. Остальные 12% приходятся на кожные покровы.

Желудочно-кишечный тракт наиболее обильно заселен микроорганизмами. Видовой состав микроорганизмов и их численность зависят от уровня, отдела ЖКТ. В желудке обитают в основном представители родов *Lactobacillus*, *Stomatococcus*, *Sarcina*. В небольшом количестве встречаются стафилококки, стрептококки, дрожжеподобные грибы и др. (Коршунов В.М., 1995).

В двенадцатиперстной кишке в здоровом организме титр микроорганизмов, населяющих этот отдел ЖКТ, составляет $10^4 - 10^5$ микробных клеток в 1 мл содержимого, видовой состав представлен лактобактериями, бифидобактериями, бактероидами, энтерококками и дрожжеподобными грибами.

Содержание бактерий в тонкой кишке варьирует от 10^4 на 1 мл содержимого, в тощей и подвздошной кишке до 10^7 на 1 мл содержимого. В верхних отделах тонкой кишки обнаруживаются преимущественно грамположительные аэробные бактерии, в нижних отделах – грамотрицательные энтеробактерии и анаэробы.

В микробиоте человека как, и в любом другом микробиоценозе, выделяют постоянно обитающие виды (автохтонные, индигенные), составляющие 90% от общего числа микроорганизмов, а также сопутствующие (факультативные) – 10% и транзиторные (аллохтонная) – 0,01%. Основная микрофлора толстой кишки включает в себя анаэробные бактерии родов *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, непатогенные штаммы клостридий. Аэробные бактерии (лактобактерии, кишечные палочки, энтерококки) составляют сопутствующую микрофлору. К остаточной микрофлоре относят стафилококки, клостридии, протей, грибы. (Ильин В.К. и др., 2005).

К преобладающей флоре относят бифидобактерии, лактобактерии, пропионибактерии, эшерихии, пептострептококки и энтерококки, а к факультативной и транзиторной флоре – бактероиды, пептококки, стафилококки, стрептококки, бациллы (аэробные спорообразующие бактерии и анаэробы рода клостридий), фузобактерии, неферментирующие бактерии (псевдомонады, ацинетобактер), дрожжеподобные грибы. Представители семейства *Enterobacteriaceae*, относящиеся к группе условно-патогенных бактерий рода *Klebsiella*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Proteus* и др. (Лянная А.М. и др., 1999).

1.2. Нормобиоценоз и дисбактериоз ЖКТ

1.2.1. Понятие нормобиоценоза и дисбактериоза

Микроорганизмы и кишечная стенка формируют единый микробно-тканевой комплекс благодаря микроколониям бактерий, слизи (муцин), эпителиальным клеткам слизистой оболочки, а также клеткам слизистой оболочки.

Микробиоценоз выполняет функции по поддержанию гомеостаза, обеспечивает колонизационную резистентность, принимает участие в формировании иммунного ответа, обеспечивает переваривание пищи, регулирует моторную функцию кишечника, дезинтоксикацию, витаминизирующая функция (Воробьев В.М. и др., 2004).

Основу нормальной микрофлоры пищеварительного тракта здорового человека составляют облигатно-анаэробные микроорганизмы, главными представителями которых являются бифидобактерии (Гончарова Г.И. 1986).

Нормальная микрофлора - эволюционно сложившаяся экологическая система симбиотических микроорганизмов, населяющих открытые полости человека и поддерживающие метаболическое, биохимическое и иммунологическое равновесие, необходимое для здоровья человека (Бондаренко В.М., 2007).

Микробиота взрослого человека содержит 10-100 триллионов микробов, общей массой от 1 до 2,5 кг. В толстом кишечнике содержится около 1,5 кг различных микроорганизмов. В 1 грамме содержимого слепой кишки обнаруживают около 2 миллиардов микробных клеток. На жизнедеятельность кишечной микрофлоры расходуется до 10% поступившей энергии и 20% объема принятой пищи. Толстая кишка человека в наибольшей степени колонизирована микроорганизмами. количество бактерий в фекалиях доходит до $5,0 \times 10^{12}$ КОЕ/г содержимого.

Для нормобиоценоза (эубиоза) здоровых людей, характерно наличие анаэробных бактерий в количестве до 90-98% от общего количества микроорганизмов кишечника. Анаэробными являются микробы, способные существовать без свободного кислорода. Аэробные формы могут существовать только в присутствии кислорода. Это, как правило, кишечные палочки, стрептококки, энтерококки, в сумме не более 5-10% от всей заселяющей кишечника человека аутофлоры.

Нормальная микрофлора кишечника по количественным соотношениям представлена тремя основными группами.

1. Основная или облигатная микрофлора представлена бифидобактериями и бактероидами и составляет 90-95% микробиоценоза человека.

2. Сопутствующая микрофлора сформирована в основном из аэробов – кокки, лактобактерии, кишечная палочка. На их долю приходится 5% от всего микробиоценоза.

3. Остаточная микрофлора или факультативная. К этой группе относятся стафилококки, кандиды, протеи, синегнойная палочка, энтеробактерии, кампилобактерии. На долю данной группы бактерий приходится 1% от общего количества микроорганизмов.

По локализации в кишечнике микроорганизмы можно разделить на 2 группы.

Первая группа – мукоидная (микозная) микрофлора, которая тесно связана с эпителием слизистой оболочки кишечника. В состав данной группы входят бифидобактерии и лактобактерии.

Вторая группа – полостная микрофлора, представлена микроорганизмами, которые находятся в просвете кишечника. Как правило, это бактероиды, вейлонеллы, энтеробактерии.

Бифидобактерии являются наиболее полезными пробиотическими микроорганизмами, а также это самая распространенная культура в толстом

кишечнике человека (Avast N. et al.,2015). На сегодняшний день известны 84 признанных таксонов бифидобактерий с 76 видами и 8 подвидами (*Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium suis*, *Bifidobacterium catenulatum*, подвида *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium saeculare* и т.д.). (Duranti. S et al., 2019).

Лактобактерии включают 44 вида, основными являются *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.plantarum*, *L.fermentum*. Лактобактерии в ходе своей жизнедеятельности вырабатывают молочную кислоту, спирт, лизоцим, продукты с высокой антибиотической активностью, интерферонов. Благодаря этим продуктам происходит подавление гнилостных микробов. Снижение количества лактобактерий приводит к защелачиванию среды, резко снижая утилизацию кишечником биологически активных веществ. (Поспелова В.В. и др.,1992).

Клостридии участвуют в расщеплении желчных кислот, поддерживают колонизационную резистентность, подавляют рост патогенных клостридий. *Clostridium difficile* и *Clostridium perfringens* способны вырабатывать энтеротоксины. Микробные пептидные токсины оказывают провосполительный эффект, выделяют сериновые протеазы, формируют хроническое воспаление. Развитие псевдомембранного колита, обусловленного *Clostridium difficile*, связано с применением ряда антибиотиков, подавляющих нормальную микрофлору и резким снижением количества нетоксигенных клостридий.

Бактероиды мало изучены на сегодняшний день. Участвуют в расщеплении желчных кислот. *Bacteroide fragilis* обладает факторами патогенности. В литературе есть данные, что 10% случаев диарей вызваны энтеротоксигенными штаммами *Bacteroide fragilis*. Диареи у детей дошкольного возраста часто обусловлены бактериоидами. (Лихачева А.Ю. и др.,1999).

Эшерихии продуцируют колицины, которые тормозят рост энтеропатогенных штаммов кишечной палочки, принимают участие в синтезе витамина К. Госпитальные штаммы обладают множественной резистентностью к антибактериальным средствам, что является причиной развития госпитальной инфекции.

Цитробактер, энтеробактер, протеи, клебсиеллы при снижении иммунитета приводят к изменению функций кишечника, развитию воспалительных процессов в результате воздействия токсинов. (Бондаренко В.М. и др.,2007).

Отношение анаэробов к аэробам в норме постоянно- 10:1. Обязательных и факультативных анаэробов всегда на порядок больше аэробов. Это связано с наличием зоны в области, непосредственно прилегающей к эпителию, в которой благодаря работе натриевых насосов на плазматических мембранах эпителиоцитов и своеобразию структуры поверхностных гликопротеидов поддерживается отрицательный потенциал. Кислород в этой зоне отсутствует. По этому принципу выстраивается и «этажность» расселения различных видов бактерий. В тесном контакте с эпителием находятся строгие анаэробы (бифидобактерии, бактероиды), далее располагаются факультативные анаэробы, выше – аэробы.

Полноценное функционирование всего человеческого организма осуществляется за счет работы микробиоценоза кишечника при правильном соотношении полезных и условно-патогенных микроорганизмов – это состояние нормобиоценоза. Количественное и качественное нарушение нормальной микрофлоры – дисбактериоз или дисбиоз. Дисбиоз («dis» - нарушение, расстройство, «bios» - жизнь) – это нарушение функционирования и механизмов взаимодействия организма человека, его микрофлоры и окружающей среды.

Термин "дисбактериоз" был введен в клиническую практику в 1916 году немецким врачом А. Ниссле для обозначения явлений бродильной и

гнилостной диспепсии. Существуют различные интерпретации этого термина. С микробиологической точки зрения дисбиоз выражается в снижении количества облигатной флоры кишечника (бифидо- и лактобактерий, кишечной палочки) (Соколова К.Я., 1999).

За рубежом чаще используют термин "синдром избыточного бактериального роста" в тонкой кишке (СИБР). Его определение носит более конкретный характер, и постановка диагноза базируется на обнаружение более 10^5 микроорганизмов в одном мл аспирата из тощей кишки и/или появление флоры, характерной для толстой кишки.

В последние годы проблема дисбактериоза вызывает особый интерес у специалистов различного профиля. Некоторые авторы подчеркивают, что дисбактериоз или дисбиоз - не заболевание, а отклонение от нормы одного из параметров гомеостаза, который зачастую не требует обязательного лечения. Он всегда вторичен и причинно обусловлен. Данная точка зрения имеет важное практическое значение, так как исключает принадлежность дисбактериоза к самостоятельным болезням человека. В то же время сама возможность наличия такого патологического состояния, как дисбактериоз, никем не отрицается, так как в основе его развития лежат многообразные изменения в качественном и количественном составе микрофлоры пищеварительного тракта (Шендеров Б.А., 1998).

По данным РАМН более 90% населения России в той или иной мере страдает дисбактериозом. По данным зарубежных исследователей каждый житель планеты в течении всей жизни имеет какие-либо отклонения от нормобиоценоза. Дисбактериоз возникает в результате качественного и количественного изменения микрофлоры кишечника.

Регулярный дефицит лактобактерий и бифидобактерий приводит к иммунологической несостоятельности слизистых желудочно-кишечного тракта, нарушению колонизационной резистентности. Слизистые желудочно-

кишечного тракта заселяются условно-патогенными микроорганизмами, что ведет к дальнейшему ослаблению клеточных и гуморальных факторов защиты и проявляется в незавершенности фагоцитоза, снижении активности макрофагов, снижении количества комплемента, лизоцима, бактерицидных свойств сыворотки крови. Следствием этого является формирование вторичных иммунодефицитов и активизация хронических бактериальных и медленных вирусных инфекций, что ведет к формированию в организме хронических очаговых воспалительных процессов.

1.2.2. Определение микробиоты кишечника

Определение качественного или количественного состава микробиоты кишечника человека и установления присутствия или отсутствия отдельных видов микроорганизмов для установления изменения, связанного с нарушениями нормальной микробиоты человека.

Основным методом является посев кала на дисбактериоз. Так же известны такие методы как копрограмма, дыхательные тесты, бактериологическое исследование биоптатов из тощего кишечника.

Критерии оценки дисбактериоза основываются на микробиологическом анализе кала. Отмечают снижение полноценной кишечной палочки. Увеличение количества кишечной палочки с измененными биологическими свойствами (ферментативная активность, безиндолные, неподвижные). Появление гемолитической кишечной палочки и стафилококков, отсутствующих в норме. Снижение или исчезновение анаэробной флоры, в частности бифидобактерий. Наличие условно патогенных микроорганизмов. Синдром избыточного бактериального роста.

На сегодняшний день к классическому анализу на дисбактериоз кишечника добавились современные молекулярно-генетические и другие методы исследования. Колонофлор-16 – молекулярно-генетический анализ микробиоценоза толстого кишечника методом ПЦР. Исследуемый материал

– кал. Метод заключается в комплексном исследовании фекальных образцов методом полимеразной-цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени с целью количественной оценки.

Хромато-масс-спектрометрия по Осипову – это метод лабораторного исследования крови, эпителия, мочи и других биообразцов человека. Благодаря газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией по содержащимся в клеточной стенке длинноцепочечным жирным кислотам и жирным альдегидам фосфолипидам определяют более 50 доминантных родов и видов микроорганизмов – потенциальных участников воспалительных процессов.

Полное геномное секвенирование - молекулярно-генетический анализ микробиоценоза толстого-кишечника методом секвенирования. Материалом для исследования служит кал. Данный метод представляет комплексное исследование фекальных образцов методом секвенирования, основанного на анализе гена 16s РНК прокариот. Определяются более 300 родов и 260 видов.

1.3. Систематика, морфология, физиология и экология бифидобактерий

Впервые бифидобактерии описал Тисьер в 1900 году. Он выделил из фекалий грудного младенца анаэробные клетки специфической Y-образной формы и дал им название *Bacillus bifidus* (Poupard et al.,1973 Winslow et al., 1917). Через 3 года Холланд назвал штамм, выделенный Тисьером *Lactobacillus bifidus* (Holland, 1920). В 1924 –ом году Орла – Йенсен отнес род *Bifidobacterium* к отдельному таксону (Prasanna et al.,2014). В 1957-ом году Денерт впервые обнаружил существование множества биотипов внутри рода *Bifidobacterium* и предложил систему дифференцировки пяти групп этих бактерий, которая была основана на характере сбраживания ими углеводов (Dehnert, 1957). В НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.

Габричевского видовую принадлежность бифидобактерий определяли по их ферментативной активности в отношении углеводов и многоатомных спиртов, руководствуясь классификационной схемой Ройтери и Берги (1974).

Благодаря использованию молекулярных методов, а именно анализу сиквенсов 16S рибосомальной РНК, удалось классифицировать представителей рода *Bifidobacterium* (Downts et al.,2010). Род *Bifidobacterium* входит в семейство *Bifidobacteriaceae*. Порядок *Bifidobacteriales*. Подкласс *Actinobacteridae*. Класс *Actinobacteriales* в связи с высоким содержанием GC –пар (>55моль%) в ДНК данных микроорганизмов. Отдел *Firmicutes*. Царство *Bacteria*.

Bifidobacterium - род грамположительных, каталазонегативных (кроме *Bifidobacterium indicum* и *Bifidobacterium asteroides*), неподвижных и не спорообразующих бактерий, принадлежащих к типу *Actinobacteria*. Они являются облигатными, частично факультативными анаэробами. Не образуют в процессе жизнедеятельности газы.

Для рода *Bifidobacterium* характерен полиморфизм. Полиморфизм меняется в зависимости от вида. Некоторые виды более полиморфны, в то время как другие виды более гомогенны по морфологии. Их размер 0,5-1,3 ×1,5-8 мкм². Бифидобактерии могут образовывать ветви, V – образные фигуры, булабовидные формы, могут располагаться в парах и по одиночке. Форма колоний зависит от питательных сред. На более богатых средах морфология *Bifidobacterium* представлена в виде палочек. На обедненных средах характерен большой полиморфизм (Exterkate F.A. et al.,1970)

Потребности бифидобактерий в биологически активных веществах велики и разнообразны. Многие виды нуждаются в биотине, пантотеновой кислоте, ненасыщенных жирных кислотах, цистеине, гистидине, рибофлавине, пуриновых и пиримидиновых основаниях. Пептидах, аминокислотах, олигосахаридах. Некоторые штаммы растут при наличии

азотфиксирующих олигосахаридов – N-ацетил-глюкозамина, N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-маннозамина, которые отсутствуют в коровьем молоке (Nebra Y. et al., 1999). В синтетических средах бифидобактериям для роста необходимы железо, магний, фосфаты, хлориды калия, и натрия. В коровьем молоке бифидобактерии развиваются медленно. Так как коровье молоко не является естественной средой их обитания. Могут усваивать гидролизованный казеин. Обладают низкой фосфатазной активностью (Квасников и др., 1975).

На плотных питательных средах бифидобактерии образуют различные колонии: полушаровидные, плоские, шероховатые, блестящие, окруженные валиком, имеющие более темный центр, от белого и серого до темно-коричневого. Диаметр от 0,5 до 5,0 мм. На полужидких питательных средах колонии в виде «гвоздиков», «крошек» (Домотенко и др., 2014).

Бифидобактерии способны образовывать разбухшие, шаровидные формы при развитии в неблагоприятных условиях – неподходящая кислотность среды, температура культивирования, недостаточно питательная среда.

У бифидобактерий гетероферментативный тип брожения. Активно сбраживают сахарозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, мелибиозу, раффинозу, лактозу и др. углеводы с образованием преимущественно уксусной и молочной кислот в молярном соотношении 3:2. Не образуют каталазу, CO_2 , H_2S , не восстанавливают нитраты в нитриты, не обладают уреазной активностью, не разжижают желатин. Предельная кислотность сквашенного бифидобактериями молока через 2-4 суток составляет 100-130°Т. Образуются примеси муравьиной и янтарной кислот, а также этанола. Оптимальный pH – 4,5-8,5, при pH ниже 4,5 и выше 8,5 рост бактерий прекращается. Оптимальная температура роста от 36°С до 38°С (41-43°С для видов животного происхождения). Не отмечается роста при температуре ниже 20°С

и выше 46°C за исключением – *Bifidobacterium thermacidophilum*, который способен расти при 47°C. (Biavati et al.,2000). В литературе отражается, что *Bifidobacterium longum* при тепловых стрессах выделяет малый белок теплового шока (SHSP). *Bifidobacterium longum* способен выживать при 55°C в течение 30 и 60 минут (Khaskheli et al.,2015).

1.3.1. Тип дыхания бифидобактерий.

Бифидобактерии – анаэробы. Для некоторых штаммов, таких как *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Bifidobacterium lactis* характерна аэротолерантность (Simpson et al.,2004). Аэротолерантность штаммов проявляется благодаря наличию слабой каталазной активности или действием НАДН – оксидазы (Oberг et al.,2013).

У штаммов с высокой чувствительностью к кислороду именно накопление перекиси водорода является губительным фактором, так как она инактивирует ключевой фермент углеводного метаболизма бифидобактерий – фруктозо-6-фосфат-фосфокетолазу (Zhihong et al., 2015). Другим штаммам бифидобактерий для роста необходим низкий окислительно-восстановительный потенциал, в связи с этим они не накапливают перекись водорода. Продукты брожения приводят к торможению роста бифидобактерий из-за повышенного окислительно-восстановительного потенциала. На сегодняшний день известно, что восстановленная НАДН – пероксидаза и супероксиддисмутаза играют роль в защите от токсического действия кислорода у штаммов *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* (Talwalkal et al.,2004). Причина непереносимости кислорода внутри группы близкородственных микроорганизмов может отличаться для разных штаммов.

При первичном выделении бифидобактерии являются строгими анаэробами, в процессе лабораторного культивирования они приобретают способность развиваться при доступе кислорода, а в высокопитательных

средах могут расти и в полностью аэробных условиях. (Квасников и др., 1975; Меркулова и др., 2012).

1.3.2. Местообитание

Бифидобактерии обитают в кишечнике человека, полости рта, вагинальной полости, желудочно-кишечном тракте животных, кишечнике насекомых, кисломолочных продуктах и сточных водах (Бондаренко и др., 2007).

В кишечнике человека взрослого человека с наибольшей частотой в биоценозе преобладают виды *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, а *Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium breve* – преимущественно у детей грудного возраста. Виды *Bifidobacterium. bifidum* и *Bifidobacterium longum* выявляются у здоровых всех возрастов, вид *Bifidobacterium adolescentis* свойственен только взрослым людям и детям старшего возраста; у пожилых людей начинает преобладать. Культуры данных видов бифидобактерий обладают выраженными лечебными свойствами, что позволяет использовать их в лечебно-профилактических целях при необходимости коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта человека (Амерханова А.М. et al., 2012).

В сыром молоке бифидобактерии не встречаются, но содержатся в ферментированных молочнокислых продуктах, изготовленных с применением заквасок на основе подобранных штаммов бифидобактерий (Габричевский и др., 1986; Алешкин и др., 2003).

1.3.3. Биологические свойства бифидобактерий.

1. Антиоксидантные свойства. Бифидобактерии обладают антиоксидантными свойствами. В Томском политехническом университете был поставлен эксперимент по установлению антиоксидантной активности у пробиотиков методом катодной вольтамперометрии, основанном на

процессах электровосстановления кислорода. В работе была исследована зависимость изменения антиоксидантной активности от рН среды биокомпозиции. Так как рН среды изменяется во времени с момента ее приготовления. Максимальные антиоксидантные свойства бифидобактерии проявляли при рН 5,78. При хранении кислотность биокомпозиции возрастает, а антиоксидантная активность снижается (Драчева и др., 2006).

2. Кислотоустойчивость бифидобактерий. Важной характеристикой используемых в производстве штаммов бифидобактерий является их устойчивость к кислотному стрессу. При создании и совершенствовании современных технологий получения и использования пробиотиков особое внимание уделяется селекции штаммов бифидобактерий, растущих в условиях с низким рН среды, и исследованию их физиолого-биохимических особенностей (Янковский и др., 2005).

3. Желчеустойчивость бифидобактерий. Установлено, что адаптивная реакция на кислотный стресс коррелирует с ростом устойчивости бифидобактерий к содержанию желчи в среде культивирования. В кислых средах (рН=5,0) кислотоустойчивые штаммы *Bifidobacterium adolescentis* проявляли большую толерантность к желчи, чем исходный штамм (Рябая и др., 2015).

4. Антагонистические свойства. Все виды бифидобактерий обладают выраженным антагонистическим действием по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам: *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*. Антагонистический эффект бифидобактерий обусловлен продукцией ими молочной и уксусной кислот, которые в свою очередь снижают рН в желудочно-кишечном тракте. Препятствуя развитию патогенных микроорганизмов. Помимо кислот. Бифидобактерии в процессе своего роста и развития накапливают и продуцируют антимикробные вещества –

бактериоцины (бифидин, бифилонг), которые также оказывают бактериоцидное и бактериостатическое действие на патогенную микрофлору (Квасников и др.,1975). Антагонистическую активность бифидобактерий изучают как по отдельным штаммам, так и в комплексе. Было установлено, что использование ассоциации бифидобактерий приводит к усилению антагонистической активности к возбудителям кишечных инфекций (Токаев и др., 2006).

5. Колонизационная способность бифидобактерий. Колонизирующая способность микроорганизмов во многом определяется процессом адгезии к эпителиальным клеткам кишечника. Адгезия помогает иммобилизоваться на слизистых оболочках и не подвергаться вымыванию в низ лежащие отделы кишечника. Бифидобактерии обладают высокими адгезивными свойствами. Опыты доказывающие адгезивные свойства бифидобактерий проведены в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского. При искусственном заселении бифидобактериями желудочно-кишечного тракта безмикробных животных, бифидобактерии колонизировали пищеварительный тракт и выделялись в чистой культуре. Локализация бифидобактерий в муцинах постоянно продуцируемых клетками кишечной слизистой, свидетельствует о том, что именно это может способствовать их обильному размножению, колонизацию ими кишечника и препятствию адгезии к слизистым оболочкам патогенных бактерий (Квасников и др., 1975; Банникова,1975).

6. Антибиотикоустойчивость бифидобактерий. Для бифидобактерий характерна природная устойчивость к ряду антибиотических препаратов. По данным отечественных и зарубежных ученых, все изоляты бифидобактерий, кроме *Bifidobacterium longum*, устойчивы к тетрациклину. Так же, все изоляты бифидобактерии устойчивы к аминогликозидным антибиотикам (Артюхова С.И. и др.,2014). Природная резистентность бифидобактерий к

миногликозидам обусловлена отсутствием у данных микроорганизмов опосредованного цитохромами транспорта лекарственных препаратов, а устойчивость к цефалоспорином – низкой проницаемостью их клеточной стенки для препаратов этой группы.

Низкая чувствительность штаммов *Bifidobacterium breve* связана с присутствием в их клеточной мембране специфического транспортного белка BbmR (*Bifidobacterium breve* macrolide Resistance protein), схожего с белками множественной лекарственной устойчивости. Резистентность бифидобактерий к мупироцину обусловлена функционированием у данных микроорганизмов атипичной формы изолейцил-тРНК-синтетазы (Сидоренко А.В. и др., 2013; Жиленкова О.Г., 2011)

1.3.4. Функции и влияние бифидобактерий на человека при различных заболеваниях.

Бифидобактерии выполняют в организме человека и животных важную физиологическую роль, обусловленную их защитной и синтетической функциями, а также участием в конечном звене пищеварительного процесса (метаболизме белков, липидов, углеводов). Бифидобактерии оказывают положительные влияния на структуру слизистой оболочки кишечника и ее адсорбционную способность. Ферментируя сахара, они создают в кишечнике кислую среду, способствующую всасыванию в кровь кальция, железа, неорганических фосфатов, а также витамина D. (Эрвольдер Т.М., Гудков С.А., 1981).

По данным В. Ф. Семенихиной (1970), бифидобактерии синтезируют витамины в следующих количествах (мгк %): пантотеновой кислоты 0-12, рибофлавина 0-16, тиамин 1-2.5, фолиевой кислоты 3-8, кобаламина 0.007 - 0.01. Улучшают показатели белкового, липидного и минерального обмена, так как усиливают гидролиз белков, сбраживают углеводы. Омыляют жиры. Растворяют клетчатку, стимулируют перистальтику кишечника,

способствуют нормальной эвакуации кишечного содержимого, а также способствуют синтезу незаменимых аминокислот, обладают антианемическим, антирахитическим и антиаллергическим действием.

Бифидобактерии стимулируют лимфоидный аппарат. Активируют выработку IgA в кишечнике, стимулируют фагоцитоз и образование интерлейкинов. Синтез иммуноглобулинов повышает активность лизоцима и способствует уменьшению проницаемости сосудистых тканевых барьеров для токсических продуктов патогенных и условно-патогенных организмов (Алешкин В.А. и др., 2003; Кожухметов С.С., 2007).

В литературе отмечается способность бифидобактерий к биотрансформации. Бифидобактерии могут вовлекаться в выработку энтеролактона, который обладает противоопухолевым действием (Oikarinen S. et al). *Bifidobacterium* spp. могут ферментировать полиненасыщенные жирные кислоты в пектиновые олигосахариды, которые могут задерживать развитие лейкемии и связанной с ней кахексии у мышей, и, следовательно, пектиновые олигосахариды, могут увеличивать количество *Bacteroides* spp. (Bindels Л.Б.).

В исследовании Yin et al изучали ингибирующее действие *Bifidobacterium longum* на типы трансплантированных опухолей у мышей. Когда циклофосфамид комбинировали с *Bifidobacterium longum*-pBV22210-IL-2, время выживания мышей было больше по сравнению с любым из них отдельно, что указывает на то, что *Bifidobacterium longum*-pBV22210-IL-2 обладает мощными противоопухолевыми эффектами, которые могут усиливаться при сочетании с химиотерапевтическими препаратами. (Yin et al., 2017).

Что касается кишечных заболеваний, введение бифидобактерий использовалось для улучшения симптомов непереносимости лактозы, в основном с использованием штаммов вида *Bifidobacterium animalis* (Он Т. и др., 2008) или с пробиотической смесью, содержащей штамм *Bifidobacterium*

breve и *Lactobacillus casei* (Альмейда К.С. и др., 2012). Штамм *Bifidobacterium animalis* BB-12 использовался при лечении кишечных инфекций; например, было продемонстрировано, что у детей, которых кормили детской смесью, содержащей этот штамм, было меньше и короче эпизодов диареи (Вейцман З. и др., 2005).

В варианте диареи, ассоциированной с *C. difficile* (CDAD), композиция, содержащая штамм *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus acidophilus*, была эффективной для угнетения размножения этого патогена после антибиотикотерапии (Plummer S. et al., 2004). В литературе отмечается, что штамм *Bifidobacterium bifidum* YIT4007 способен улучшить состояние слизистой оболочки желудка и другие желудочно-кишечные симптомы в результате подавления роста *Helicobacter pylori* (Мики К. и др., 2007). Найдены исследования, в которых описывается положительное влияние штаммов *Bifidobacterium animalis* BB-12, *L. rhamnosus* GG и инулина на иммунные функции у пациентов с резецированным колоректальным раком (Roller M. и др., 2007). В других работах сообщалось о способности бифидобактерий усиливать изменения фекальной микробиоты у пациентов с колоректальным раком (Wortley Д.Л. и др., 2009), а также снижать некоторые факторы риска развития путем улучшения барьерной функции эпителия и уменьшения пролиферации толстой кишки комменсальными микроорганизмами (Rafter Дж., 2007).

Недавние исследования показали, что введение бифидобактерий в рамках предоперационного лечения пробиотиками снижает частоту послеоперационной септицемии у пациентов, перенесших колэктомия (Liu Ж., 2013), и при колоректальных метастазах в печень (Liu З., 2015).

При проведении профилактики некротического энтероколита у новорожденных, бифидобактерии также оказали положительное влияние. Анализировались бифидобактерии, входящие в состав пробиотических

смесей. Коммерческий продукт, содержащий штамм *Bifidobacterium infantis*, смог снизить частоту и тяжесть некротического энтероколита у детей с очень низкой массой тела при рождении (Lin H.C. et al, 2005) и у недоношенных детей с очень низкой массой тела при рождении (Lin H.C. et al, 2008). Более того, другое исследование показало, что коммерческий пробиотический продукт, содержащий штаммы *Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium bifidum*, снижает частоту и тяжесть НЭК у недоношенных новорожденных (Bin-Nun A.,2005).

1.4. Биосурфактанты.

Биосурфактанты или микробные поверхностно-активные соединения (МПАВ) представляют собой амфифильные молекулы, содержащие гидрофобные и гидрофильные части, способствующие наличию границ раздела жидкостей с разной полярностью. Гидрофильная часть обычно состоит из одной из следующих структур: аминокислот, анионных или катионных пептидов и углеводов. Гидрофобный хвост обычно состоит из пептидов, белков или жирных кислот, которые могут быть насыщенными или ненасыщенными (Silva I.A. et al., 2021). Биосурфактанты обладают свойством снижать поверхностное и межфазное натяжение, что делает их пригодными для использования в качестве моющих средств, эмульгаторов, смачивающих агентов, пенообразователей и диспергаторов (Sobrinho et al., 2013). Способность МПАВ снижать межфазное натяжение зависит от его химической структуры. МПАВ можно разделить на две основные группы в зависимости от их молекулярной массы: низкомолекулярные (гликолипиды и липопептиды) и высокомолекулярные (полисахариды, липополисахариды, белки и липопротеины). Биосурфактанты с низкой молекулярной массой более эффективны в снижении поверхностного натяжения, тогда как биосурфактанты с высокой молекулярной массой лучше подходят для

стабилизации водонефтяных эмульсий. Химические различия в молекулярной структуре различных биосурфактантов напрямую связаны с их биологической активностью и применением (Carolin C.F. et al., 2021).

Низкомолекулярные биосурфактанты чаще всего используются в области защиты окружающей среды. Их производство связано с видами *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Nocardia*, с микроорганизмами родов *Pseudozyma* и *Ustilaginaceae* (Beck A. et al., 2020).

Рамнолипиды в основном продуцируются *Pseudomonas aeruginosa* и были первыми описанными биосурфактантами. Они образованы моно- и дисахаридами рамнозы, связанными гликолевой связью с молекулой β - гидроксигирной кислоты. Они широко используются в процессах добычи нефти и используются в сельскохозяйственном секторе для борьбы с патогенами растений и улучшения качества почвы (Kumar A. et al., 2021).

Софоролипиды представляют собой внеклеточные биосурфактанты, о которых впервые сообщалось в начале 1960-х годов как об основных продуцентах микроорганизмов *Starmerella bombicola*. Их молекулярная структура может быть циклической или ациклической, с изменением содержания софоролипидного сахара (лактонизация или ацетилирование) и длины жирной кислоты (16 или 18 атомов углерода) с разной степенью насыщения. Различные исследования показали, что софоролипиды могут быть получены из нерастворимых в воде субстратов (органических отходов), что делает их привлекательными для промышленного применения на основе стратегии экономики замкнутого цикла (Rodríguez A. et al., 2021).

Среди липопептидов циклические липопептиды, такие как грамицидин S и полимиксин, обладают антибактериальной активностью из-за их способности растворять мембранные ферменты. Сурфактин, продуцируемый *Bacillus subtilis*, также принадлежит к этой группе и считается наиболее эффективным биосурфактантом для снижения поверхностного натяжения.

Согласно литературным данным, различные типы микроорганизмов, принадлежащих к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus* и *Corynebacterium*, используются для производства биосурфактантов, при этом *Pseudomonas aeruginosa* чаще всего используется для производства рамнолипидов.

Биосурфактанты можно использовать для изменения гидрофобных свойств поверхности, что повлияет на прикрепление микроорганизмов к ним. ПАВ из *Streptococcus thermophilus* препятствует колонизации других термофильных штаммов *Streptococcus* на стали, которые ответственны за образование биопленок. Так же биосурфактанты *Pseudomonas fluorescens* препятствовали присоединению *Listeria monocytogenes* к той же стали.

Механизм действия в окружающей среде биосурфактантов основан на двух основных механизмах взаимодействия. С одной стороны, присутствие биосурфактантов увеличивает биодоступность субстрата. С другой стороны, он способствует взаимодействию с клеточной поверхностью за счет повышения ее гидрофобности, позволяя гидрофобным субстратам взаимодействовать с бактериальными клетками.

Известно, что бифидобактерии тоже могут образовывать биосурфактанты. Авторами из Кореи Йе-Джин Ким, Инонге Нони Сизия, в 2021 году в статье «Биосинтез глицеридгликозида (неионогенного поверхностно-активного вещества) амилосахаразой, мощной гликозилтрансферазой» был описан фермент, выделяемый *Bifidobacterium thermophilum*, благодаря которому бифидобактерии могут образовывать биосурфактанты.

Амилосахараза (АСаза, КФ 2.4.1.4) — многофункциональный фермент, известный своей ролью в процессах трансгликозилирования, полимеризации и изомеризации с использованием сахарозы в качестве единственного субстрата. Среди этих активностей амилосахаразы реакция трансгликозилирования может эффективно переносить глюкозу из сахарозы

в качестве молекулы-донора в гидроксильную (-ОН) группу различных соединений в качестве молекулы-акцептора (Seo et al. 2020). Среди различных микроорганизмов *Bifidobacterium thermophilum* и *Deinococcus geothermalis* являются бактериями, способными продуцировать амилосахаразу, обладающую уникальными свойствами, включая относительно высокую термостабильность при 50°C и улучшенную полимеризацию. Амилосахараза *Bifidobacterium thermophilum* (BtAS) отличается самым длительным периодом полураспада при 50°C по сравнению с другими амилолитическими ферментами. Выход трансгликозилирования BtAS составляет примерно 63% (Kim et al. 2020). Высокая термостабильность и высокий выход трансгликозилирования этого фермента обеспечивает преимущества в качестве агента промышленного производства биосурфактантов. Биосинтез неионогенных гликозидов поверхностно-активных веществ с помощью амилолитических ферментов может следовать различным возможностям в производстве новых биосурфактантов, включая синтез *de novo* гидрофильных и гидрофобных сегментов и их последующее связывание; синтез гидрофильных сегментов и зависимое от субстрата образование гидрофобных фрагментов и их последующее связывание; и синтез гидрофобного сегмента и зависимое от субстрата образование гидрофильного фрагмента и его последующее слияние (Kosarich H., Narrowed W.B., 2010).

1.5. Биопленки.

Биопленки одна из форм существования бактерий, своеобразные сообщества микробов, внутри которых они живут, размножаются и, самое главное, общаются между собой. Микробные клетки находятся внутри синтезированного ими же матрикса, который представлен по составу в основном полисахаридами, включениями белков, нуклеиновых кислот и

липидов. Это обеспечивает механическую стабильность биопленок, опосредует их адгезию и взаимодействие. Внутри этого матрикса бактериальные клетки обмениваются различными сигнальными молекулами, так называемыми автоиндукторами, изменяя экспрессию генов, а таким образом и свойства биопленки. Этот феномен получил название «Чувство кворума (Quorum sensing)».

Начальным этапом возникновения биопленки является прилипание бактерий к поверхности под влиянием различных компонентов, это зависит от вида микроорганизмов, гидрофобности и электрического заряда, экологических условий и способности микроорганизмов доставлять внеклеточные полимеры, которые помогают клетке цепляться за поверхности

Известно, что более 90% известных нам видов бактерий способны образовывать биопленки в принципе, а при хронических бактериальных инфекциях более чем три четверти штаммов демонстрируют данную способность. Именно поэтому специалисты ведут спор о целесообразности определения формирования биопленок в клинической практике, однако, с нашей точки зрения, это необходимо для адекватного назначения терапии пациентам.

Существует несколько факторов, с которыми связывают повышение резистентности у пленкообразующих микроорганизмов. Во-первых, матрикс биопленки замедляет проникновение антибиотика к микробам, выполняя таким образом барьерную функцию. Кроме того, в глубоких слоях биопленки может изменяться значение pH (Rehm В.Н., 2010).

В литературных источниках есть исследования посвященные изучению способности образовывать биопленки у *Bifidobacterium* spp. Авторы Клаудио Идальго-Кантабрана и Borja Sanchez в статье «Геномный обзор и биологические функции биосинтеза экзополисахаридов у *Bifidobacterium* spp. ть» (2014) отмечают способность бифидобактерий к образованию биопленок.

1.6. Профилактика и лечение дисбактериоза желудочно-кишечного тракта.

На сегодняшний день коррекцию нарушений микрофлоры кишечника на фоне заболеваний или после антибиотикотерапии проводят с помощью пробиотиков (Vig R. et al., 2010). Впервые термин «пробиотик» был предложен в 1965 г. D.M. Lilly и R.H. Stilwell, которые подразумевали под пробиотиками вещества, продуцируемые одними микроорганизмами для стимуляции роста других. В 1974 г. Паркер предложил использовать этот термин для обозначения препаратов из микроорганизмов, обеспечивающих баланс кишечной микрофлоры. На сегодняшний день пробиотики – это полезные для человека непатогенные и не вырабатывающие токсины живые микроорганизмы, которые обеспечивают при систематическом употреблении в пищу благоприятное воздействие на организм человека. Определено 7 критериев отбора штаммов микроорганизмов в качестве препаратов-пробиотиков: апатогенность, положительное окрашивание по Граму, резистентность к кислотам и окислителям, колонизация и адгезия к клеткам пищеварительного тракта, выделение противоколиформных факторов, резистентность к желчи, жизнеспособность, стабильность и возможность подтверждения (Humbert, 1988).

Наряду с пробиотиками достаточно часто используются пребиотики и симбиотики. Пребиотики – неперевариваемые ингредиенты пищи, которые способствуют улучшению здоровья за счет избирательной стимуляции роста и/или метаболической активности одной или нескольких групп бактерий, обитающих в толстом кишечнике. К пребиотикам относятся фруктоолигосахариды, олигофруктоза, галоктоолигосахариды, лактулоза (Дюфалак, Нормазе. Порталак, Прелакс). К пребиотическим препаратам относятся такие препараты как «Хилак Форте», «Закофальк», «Бактистатин»,

«Дайго». Синбиотики представляют собой сочетание пробиотиков с пребиотиками, что улучшает выживаемость и приживаемость в кишечнике пробиотиков, а также избирательно стимулирует рост и активацию метаболизма индигенных лактобактерий и бифидобактерий (Амерханова А.М., 2002). В состав синбиотиков входит большее количество штаммов бифидо- и лактобактерий. К синбиотическим препаратам относятся: «Лактобаланс», «Флориоза», «Флоросан», «Флора-Дофилус», «РиоФлора», «Максилак», «Энтеролактис»

С точки зрения клинической медицины, пробиотики – это БАД (биологически активная добавка к пище). БАДЫ – вещества натурального происхождения, а также продукты питания, в состав которых входят микробы нормальной микрофлоры кишечника или их метаболиты, призванные повышать защитные возможности организма, оказывать положительный эффект на физиологические функции и биохимические реакции организма, через оптимизацию его микробиологического статуса.

Основу нормофлоры составляют бактерии, относящиеся к семействам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и обладающие пробиотическими свойствами. Соответственно при создании про- и пребиотических препаратов используют преимущественно культуры лактобактерий и бифидобактерий (Гончарова Г.И., 1986).

Бифидосодержащие препараты. В состав этой группы препаратов входят штаммы бифидобактерий, обладающие антагонистической активностью против условно-патогенных микроорганизмов, за счет продукции кислот, ферментов, бактериоцинов. Эти препараты улучшают обменные процессы, нормализуют деятельность желудочно-кишечного тракта, повышают неспецифическую резистентность организма (Грачева Н.М., 2010). На сегодняшний день на Российском рынке представлены такие препараты как Бифидумбактерин (сухой) (Ланофарм, Россия), Бифиформ (Ferrosan, Дания), Линекс (Sandoz, Словения), Нормофлорин – Д (Бифиллос,

Россия), Биовестин (БИО-ВЕСТА, Россия), поликомпонентные – Бак-Сэт-форте, Бак-Сэт Бэби (Великобритания), сорбционные – Бифидобактерин-форте, Пробиофор, Бификол (Донец В.Н., 2015).

Для создания пробиотиков используют, преимущественно, живые культуры микробов - представителей индигенной флоры, выделенные от человека и обладающие такими свойствами, как: высокая адгезивность к эпителиоцитам кишечника; высокий антагонизм к условно - патогенной и патогенной микрофлоре; хорошая кислотоустойчивость к воздействию низкой рН желудочного сока, желчным кислотам, бактериоцинам и др.; способность к оптимальному росту в кишечнике; способность к длительному сохранению жизнеспособности в желудочно-кишечном тракте.

Виды бифидобактерий, входящих в состав пробиотических препаратов: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis (lactis)*, *Bifidobacterium bifidum*.

Классификация пробиотиков

№п/п	Группы пробиотиков	Характеристика пробиотического препарата	Наименование препарата
1	Монокомпонентные	Содержат один штамм бактерий - Лактосодержащие; - бифидосодержащие; - колисодержащие	Ацилакт, Бифидумбактерин, лактобактерин, колибактерин, мутафлор
2	Поликомпонентные (симбиотики)	Состоят из нескольких штаммов бактерий одного или разных видов, усиливающих	Линекс, Бификол

		действие пробиотиков	
3	Комбинированные (синбиотики)	Комбинация пробиотиков и пребиотиков (добавки, которые способствуют выживанию и усиливают действие пробиотиков)	Бифиформ, Полибактерин, бифидумбактерин-форте
4	Рекомбинантные (генно-инженерные)	Созданы на основе генно-инженерных штаммов микроорганизмов	Субалин
5	Самозэлиминирующие антагонисты (спорообразующие)	Содержат не свойственные биотопу человека самоэлиминирующие микроорганизмы рода <i>Bacillus</i>	Бактисубтил, Биоспорин
6	Сорбированные	Иммобилизационные на сорбенте живые бактерии	Пробифор Бифидумбактерин форте, Флорин форте
7	Метаболические	Продукты жизнедеятельности пробиотических штаммов	Хилак форте
8	Мультипробиотики	Состоят из 7 и более	Бак-Сэт Форте

		симбиотических штаммов бактерий	Бак-Сэт Бэби
--	--	------------------------------------	--------------

В ближайшие годы наиболее перспективными будут разработки фармацевтических препаратов и продуктов функционального питания на основе живых микроорганизмов, в большинстве своем представленных нормальной микрофлорой пищеварительного тракта человека, и в меньшей степени, выделенных из объектов окружающей среды. Возможно, это объясняется тем, что препараты, созданные на основе представителей нормальной микрофлоры человека, обладают наименьшим побочным эффектом при их длительном применении (Шендеров Б.А., 2003).

Все пробиотические штаммы должны иметь четкую морфологию, физиологию, биохимию, генетическую и технологическую характеристику, доказанную видовую принадлежность.

Что касается пробиотических свойств и характеристик штаммов бифидобактерий, именно бифидофлоре принадлежит ведущая роль в поддержании и нормализации микробиоценоза кишечника, сохранении неспецифической резистентности организма, улучшении белкового, углеводного, витаминного и минерального обмена.

В России к началу 90-х годов для производства лечебных препаратов и продуктов функционального питания были разрешены четыре штамма бифидобактерий. *Bifidobacterium bifidum 1*, *Bifidobacterium bifidum 791*, *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3*, *Bifidobacterium longum В379М*. На сегодняшний день в коллекцию пробиотических штаммов добавлены такие штаммы, как *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium brevis* (Шендеров Б.А., 2003).

За рубежом для производства пробиотических препаратов и функционального питания применяются следующие штаммы бифидобактерий: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*,

Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis* . На сегодняшний день для производства функционального питания, молочной продукции и пробиотических препаратов все чаще стали использовать штамм бифидобактерий *Bifidobacterium animalis* . Выбор основан на том, что данный штамм наиболее устойчив к кислороду (Данилевская Н.В., 2005).

Не смотря на широкий ассортимент препаратов, охватывающий основные формы нарушений микробиоценоза кишечника, проблема коррекции дисбактериоза так и не решена. Одной из причин является ограниченная антагонистическая активность к условно-патогенным микроорганизмам используемых в производстве пробиотических штаммов.

Главной причиной невысокой и непродолжительной эффективности пробиотиков является их слабая приживаемость в кишечнике, т.е. их низкая адгезивная способность (Чичерин И.Ю.,2012).

Долгое время существовало мнение, что продолжительный прием пробиотиков безопасен, однако в последние годы все чаще публикуются данные клинических наблюдений о необходимости более глубокого изучения вопросов безопасного применения пробиотиков (Senok A.C., 2005). Считают, что прием живых бактерий может приводить к развитию метаболических расстройств, возникновению инфекционных процессов, обусловленных штаммами, входящими в состав пробиотиков. Долговременный прием пробиотиков может быть ответственен за чрезмерную иммуностимуляцию лимфатического аппарата кишечника (Малов В.А. и др.,2007).

1.7. Аутопробиотики из нормофлоры кишечника человека

Свойства пробиотиков напрямую связаны с совокупностью свойств и биологических факторов активности штаммов микроорганизмов, входящих в состав пробиотического препарата. Главным показателем эффективности пробиотического препарата является его адгезивная способность, т.е.

способность прикрепиться к слизистой кишечника, закрепиться на ней и не дать возможность к заселению слизистой условно-патогенными и патогенными микроорганизмами (Амерханова А.М., 2002).

Одной из главных проблем пробиотических препаратов на основе производственных штаммов является их низкая адгезивная способность. Большинство применяемых препаратов проходят транзиторно через желудочно-кишечный тракт и положительный эффект от приема пробиотического препарата заметен только во время его приема. Как правило адгезивная способность таких препаратов составляет менее 1%. Низкая адгезивная способность связана с тем, что при дисбактериозе, участки адгезии заняты условно-патогенными бактериями. Для устранения условно-патогенных микроорганизмов назначаются антибиотические препараты, которые приводят к усилению степени выраженности дисбактериоза (Грачева Н.М., 2010).

В связи с этим применять пробиотики приходится длительное время. За время приема в кишечнике создаются новые искусственные биоценозы, в состав которых входят производственные штаммы бифидобактерий и лактобактерий, которые способствуют восстановлению микробиоценоза (Бондаренко В.М., 2007). Сформировавшиеся биоценозы в организме могут вызывать дисбаланс в аутомикрофлоре хозяина, в результате антагонизма индигенных и промышленных штаммов (Шендеров Б.А., 2003).

На сегодняшний день одним из направлений профилактики и терапии дисбактериозов стало применение аутоштаммов в качестве пробиотических.

Аутопробиотики – штаммы нормальной микрофлоры (лактобактерии, бифидобактерии), выделенные от одного человека и направлены для коррекции его микробиоценоза.

В научных работах отмечается, что пероральное введение в организм морских свинок аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий, не

инициировало повреждения клеточных мембран лимфоцитов. В то время как постановка лимфоцитотоксического теста с пробиотическими бифидобактериями и лактобактериями отмечалось возрастание числа разрушенных лимфоцитов. Такая реакция на пробиотические микроорганизмы из коммерческих пробиотических препаратов свидетельствует о их чужеродности по отношению к организму хозяину в данном случае морских свинок (Шендеров Б.А., 2003).

По мнению Б.А.Шендера, в период внутриутробного развития организм ребенка готовится принять микрофлору матери в качестве «своей». У плода формируется иммунологическая толерантность к нормальной микрофлоре матери.

Адгезивная способность аутоштаммов выше, адгезивной способности промышленных штаммов. Установлено, что лактобактерии вагинального происхождения лучше прикрепляются к клеткам вагинального эпителия, в сравнении со штаммами, выделенными, например, из пищевых продуктов (Kirjavainen P.V., 1998).

Исследования в большинстве посвящены разработке аутопробиотиков на основе естественных микробиоценозов толстого кишечника человека, для восстановления и коррекции дисбиотических нарушений человека (Кириленко М.А., 2015).

Жидкий аутопробиотик «Лакти», в основе которого биомасса лактобактерий в питательной среде МРС-1, с добавлением сахарозо-желатиновой среды. Данный аутопробиотик можно применять с целью профилактики, так и с целью коррекции дисбиозов. (Черных Л.Е., 2002).

В России в 2006 году ученым Ван Ликуй осуществлены попытки выделения аутоштаммов лактобактерий у 9 женщин, страдающих бактериальным вагинозом. Отмечалось эффективное приживление

собственных лактобактерий во влагалище и снижение рецидивов заболевания.

В 2009 году в Германии R.Kirkaam предложил технологию выделения аутоштаммов лактобактерий. Выделенные маточные культуры аутоштаммов хранили путем лиофилизации.

Денисовой Н.Г. показано, что у 66 женщин произошло восстановление биоценоза влагалища при лечении бактериального вагиноза культурой собственных штаммов лактобактерий. Установлено, что использование аутоштаммов лактобактерий обеспечивает формирование нормоценоза влагалища и достоверно снижает риск развития рецидивов бактериального вагиноза при их применении (Денисова Н.Г., 2008).

Изготовление жидкой биомассы аутоштаммов лактобактерий предложила Черных Л.Е. в 2002 с целью применения для коррекции при дисбактериозе и поддержания микробиоценоза кишечника и генитального тракта (Черных Л.Е., 2002).

Из выше сказанного следует, в коммерческих бактериальных препаратах отсутствует эффект из-за слабой их адгезивной способности к эпителиальным клеткам кишечника. В тоже время аутоштаммы бифидобактерий и лактобактерий обладают лучшей адгезивной способностью, лучше встраиваются в микробиоценоз кишечника. Особенно необходима коррекция аутоштаммами онкобольным, когда им назначают цитостатики, гормоны, антибиотики, лучевую терапию.

Надо сказать, что аутоштаммы бифидобактерий и лактобактерий не оказывают положительное влияние на восстановление кишечной микрофлоры у подопытных животных с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, в отличие от метаболитов лактобактерий и пребиотиков, способных оказать восстанавливающий эффект (Чичерин И.Ю., 2013). Вероятно, это связано с тем, что точки прикрепления в кишечной стенке заняты условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) и поэтому

необходима декантамация УПМ из слизистой кишечника, например метаболитами бактерий индигенной микрофлоры здорового человека.

Применение аутоштаммов возможно не только в терапевтических целях, но и в качестве профилактического средства. Периодическое пополнение дефицита микрофлоры с помощью собственных, выделенных микроорганизмов, позволит избежать более серьезных дисбиотических состояний. Повышение адаптационных возможностей организма крайне актуально в современных условиях жизни. Регулярные физические и эмоциональные перегрузки, постоянные стрессы оказывают крайне негативное влияние на организм в целом и на микробиом в частности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования был использован кал, взятый у 25 пациентов гастроэнтерологического центра в возрасте от 4 до 72 лет. Из них 15 женщин, 3 мужчин и 7 детей (4 мальчика и 3 девочки). Первоначально биологический материал исследовали на дисбактериоз, затем выделяли бактерии, составляющие нормофлору кишечника - лактобактерии и бифидобактерии. Учитывая сложность при культивировании бифидобактерий, выделение чистой культуры проводили через получение накопительных культур.

2.1. Методика бактериологического исследования кала на дисбактериоз.

Образец кала собирают в утренние часы, помещают в стерильную баночку и доставляют в бактериологическую лабораторию в течение 1-2 часов.

Исследование кала начинали с растирания 1 г нативных фекалий в ступке с 9 мл физиологическим раствором (10-1). Из этого разведения делали посев на плотные питательные среды, обычно применяемые для выделения патогенных энтеробактерий (среду Плоскирева, среды Плоскирева или Левина с синтомицином или другим антибиотиком). Одновременно делали массивный посев из нативного кала на жидкие среды обогащения (Мюллера, селенитовую, магниевую).

Из основного разведения 1:10 делали дополнительные разведения в физиологическом растворе до 10^{-3} - 10^{-5} , затем из пробирки, в которой фекалии разведены до 10^{-5} , вносили по 0,1 мл на поверхность среды Эндо, Левина, Сабуро, и 0,01 мл на 3 - 5 % кровяной агар. Для получения роста изолированных, доступных для счета, посев чашки растирали шпателем до полного впитывания посева в агар.

Для посева на определение бифидобактерий делали дополнительно еще 2 - 3 разведения до 10^{-7} - 10^{-9} - 10^{-11} . В первую пробирку с 9 - 10 мл среды Блаурокк вносили 1 мл из разведения фекалий 10^{-7} , во вторую - 0,1 мл из этого же разведения, в третью и четвертую пробирку вносили соответственно по 1,0 и 0,1 мл из разведения 10^{-9} , а в пятую и шестую по 1,0 и 0,1 мл из разведения 10^{-11} . Все среды, за исключением среды Сабуро, помещали в CO_2 -инкубатор при температуре 37° .

Через 20 - 22 часа на среде Эндо подсчитывали число и процент лактозонегативных (бесцветных) колоний по отношению ко всему числу выросших колоний. Колонии со слабовыраженными ферментативными свойствами (слабое разложение лактозы - розовые колонии) подсчитывали по отношению к общему числу колоний кишечной палочки.

С чашек со средами Эндо, Левина, Плоскирева выделяют не менее 4 - 5 колоний, отличающихся по морфологии, окраске на среды Рессела с мочевиной и солью Мора или на среду Олькеницкого, а также в пробирку с бульоном, под пробку которой подвешена индикаторная бумажка для определения индола. В дальнейшем лактозонегативные культуры изучают прежде всего в отношении принадлежности к патогенным энтеробактериям.

Рост микробов рода *Протея* характеризуется разложением мочевины и окрашиванием среды Рессела в фиолетово-коричневый цвет при индикаторе тимоловый синий + кислый фуксин или оранжевый при индикаторе ВР, на среде Олькеницкого - в оранжевый цвет.

На 3 - 5 % кровяном агаре учитывают процентные соотношения колоний кишечной палочки, обладающих и не обладающих гемолизирующими свойствами; соотношения колоний кишечной палочки и кокковых форм; соотношения гемолизирующих и негемолизирующих кокков. Количество в 1 г фекалий указанных групп микробов учитывают, как это было указано, на среде Эндо.

С 5 % кровяного агара пересевают колонии разного вида на скошенную поверхность слабощелочного агара. После 20 - 22-часовой инкубации в термостате при 37°. проводят микроскопию окрашенных по Граму мазков. Культуры стафилококка проверяют в реакции плазмокоагуляции и в отношении лецитиназной активности на желточно-солевом агаре.

Для определения плазмокоагуляции петлю агаровой культуры стафилококка вносят в пробирку с 1 - 2 мл стерильной кроличьей или человеческой плазмы разведенной, 1:5*. Посевы помещают в термостат и проверяют результат через 30 минут, 2 - 4 и 24 часа. В качестве контроля ставят пробирки с плазмой без добавления культуры и с плазмой, в которую посеян заведомо коагулирующий стафилококк. При свертывании плазма полностью уплотняется или в пробирке плавает сгусток.

Для определения лецитиназной активности делают посев секторами на чашку с желточно-солевым агаром (на одну чашку можно посеять 4 - 8 культур). Посев инкубируют 24 - 48 часов при 37°, после чего учитывают результат.

Лецитиназоположительной считают культуру, вокруг которой образуется радужный венчик.

Для дифференциации энтерококка от прочих диплококков и диплострептококков применяют следующие тесты: способность расти и редуцировать метиленовую синьку в молоке, как наиболее надежный тест, рост в бульоне с 40 % желчи, расщепление маннита, терморезистентность (выживание при прогревании при 60° - 30 минут).

С целью обнаружения патогенных грибов посевы на среде Сабуро инкубируют в течение 3 - 5 дней при 28 - 30°, выделяют плотные непрозрачные колонии в пробирки со скошенной поверхностью этой же среды. Посевы снова выдерживают в термостате при той же температуре 3 - 4 суток, после чего проводят микроскопию препарата из живой культуры в капле стерильной водопроводной воды при помощи объектива 40, окуляра

10. К патогенным грибам относят культуры почкующихся клеток при наличии длинных нитей мицелия (псевдомицелий) или более коротких нитей (истинный мицелий).

Для определения анаэробных бифидобактерий посевы на среде Блаурокк выращивают при 37° в течение 48 часов. Из посевов, в которых виден рост в виде помутнения всей среды, в виде отдельных колоний или тяжей, готовят окрашенные по Граму мазки. Обнаружение характерных грамположительных палочек с разветвлениями на концах, расположенных в виде римской цифры V, с несколько утолщенными концами или в виде скоплений, напоминающих китайские иероглифы, подтверждает их принадлежность к бифидобактериям. При отсутствии роста через 48 часов посевы оставляют в термостате до 72 часов.

Выделение чистой культуры *Bifidobacterium bifidum* является весьма трудоемким и практически необязательным, так как определение разведения, в котором обнаруживают *Bifidobacterium bifidum*, является вполне достаточным для оценки нормального или пониженного их содержания в фекалиях.

Исследования указанных представителей кишечной микрофлоры не исчерпывает весь биоценоз кишечника, тем не менее позволяет выявить нормальное или нарушенное состояние кишечной микрофлоры.

2.2. Выделение чистой культуры бифидобактерий.

Для выделения индигенных штаммов и осуществления пересевов использовали Питательную среду для культивирования и выделения бифидобактерий ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск. Титрацию бифидобактерий проводили на полужидкой бифидо-среде. Пробирки со средой готовили в день посева. Хранение среды допускается до 2-х недель в холодильнике, но перед применением необходимо среду регенерировать на водяной бане в

течение 15 минут с целью удаления кислорода из толщи среды. Чашки с твердой питательной средой готовили за сутки до посева на них. В стерильные чашки Петри разливали биф-агар, когда среда застывала, чашки убирали в анаэроостат на 24 часа, с целью насыщения среды углекислым газом.

Получение накопительных культур. Брали навеску кала 0.5 грамма, тщательно растирали ее в стерильной баночке в 5 мл физиологического раствора, затем 5мл растертого образца помещали в пенициллиновый флакон с бифидум-средой и добавляли 0,1мл мупироцина. Флакончик закрывали ватно-марлевой пробкой и помещали в анаэроостат при 37С на 48 часов.

Закачка анаэроостата. Откачать вакуумным насосом воздух до -0,06 мРа и заполнить азотом до 0 мРа. Повторить манипуляции 3 раза.

После культивирования доставали флакончик, титровали на жидкой биф-среде до 8 разведения. Посев на чашки с твердой биф-средой производили с -4,-5,-6 разведения по 0,1мл. Чашки с посевами убирали в анаэроостат на 24 часа при 37С.

Получение чистой культуры. После культивирования в анаэроостате доставали чашки и делали мазочки всех выросших колоний. Характерные для бифидобактерий колонии отбирали и пересевали в маленькие пробирки с 10 мл жидкой питательной бифидо-средой, закрывали ватно-марлевой пробкой и убирали в анаэроостат на 48 часов. Затем доставали пробирки и раститровывали на чашках до -6 разведения. Чашки инкубировали в анаэроостате при 37С. Выросшие колонии по морфологии похожие на колонии бифидобактерий отправляли на идентификацию в городскую клиническую больницу №6 для идентификации на масс-спектрометре. Согласно библиотечным базам данных определение проводили до рода (*Bifidobacterium* spp) После подтверждения колонии, 3 раза проводили через

жидкую и твердую питательную среду. В качестве ростостимулирующей добавки в бифидо-среду производства ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск добавляли 1мл/л Твин-80.

2.3. Методика идентификации на масс-спектрометре (MALDI-TOF)

MALDI–TOF MS – матрично-активированная, автоматическая лазерная дисорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией. VITEK® MS позволяет быстро определить видовую, родовую принадлежность исследуемого микроорганизма.

Пробо-подготовка образца перед исследованием. На подложке масс-спектрометра смешивают матрицу (2',5'-дигидроксибензойная кислота) с колонией бактерий, которую хотят идентифицировать. По времени процесс занимает, к примеру, для 24 изолятов – 10 минут.

Процесс идентификации начинается с того, что образец, смешанный с матрицей, помещают в прибор и подвергают его высокой интенсивности лазерному облучению длительностью несколько наносекунд. После такого воздействия из образца и матрицы происходит выброс микрочастиц. Заряженные молекулы матрицы, взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от участка ионизации к месту детекции с ускорением, обратно пропорциональным их атомным массам.

Идентификация микроорганизмов основывается на получении общего масс-спектра белков в диапазоне 1000-10000 дальтон и биоинформационном сравнении полученного спектра с базой данных референсных спектров. Применение метода позволяет значительно сократить затраты и время бактериологического анализа и увеличивает его точность. На идентификацию одного микроорганизма требуется меньше 2-х минут. База данных VITEK® MS состоит из клинически значимых видов (бактерий,

дрожжей, плесневых грибов / дерматофитов, микобактерий) и превосходит большинство видов, встречающихся в ежедневной практике микробиологической лаборатории.

2.4. Методика хранения культур *Bifidobacterium spp.*

Культуру бифидобактерий выращивали на жидкой бифидум-среде без добавления агара. Полученную культуральную жидкость раскапывали в эппендорфы по 1,2мл. Эппендорфы помещали в центрифугу SIA «ELMI», LV-1600 откручивали при 3000 оборотах в течении 3 минут. Затем пипеткой отбирали надосадочную жидкость и добавляли криопротектор в объеме 0,8мл. Эппендорфы хранили в криобоксах в морозильной камере при -82С°. Состав криопротектора: 85мл дистиллированной воды + 5гр лактозы+ 10мл глицерина. Режим стерилизации для криопротектора 110С° 10 минут.

2.5. Хранение выделенных культур *Bifidobacterium spp.*

Выделенную культуру бифидобактерий выращивали на жидкой бифидум-среде без добавления агара. Полученную культуральную жидкость раскапывали в эппендорфы по 1,2мл. Эппендорфы помещали в центрифугу SIA «ELMI», LV-1600 откручивали при 3000 оборотах в течении 3 минут. Затем пипеткой отбирали надосадочную жидкость и добавляли криопротектор в объеме 0,8мл. Эппендорфы хранили в криобоксах в морозильной камере при -82С°. Состав криопротектора: 85мл дистиллированной воды + 5гр лактозы+ 10мл глицерина. Режим стерилизации для криопротектора 110С° 10 минут.

2.6. Методика определения кислотообразующей активности по Тернеру.

Кислотообразующую активность штаммов бифидобактерий, выделенных из образцов кала, определяли по титруемой кислотности при культивировании бактерий в жидкой питательной среде. Испытание количественного определения кислотообразующей активности проводили методом кислотно-основного титрования (Бегунова А.В. и др., 2020).

Реактивы, используемые в исследовании: титрованный 0,1М раствор натрия гидроксида, индикатор 1% раствор фенолфталеина.

Образец для исследования перемешивали пипеткой 8-10 раз. Каждую пробу в объеме 10мл вносят в отдельную коническую колбу или стакан вместимостью 100мл. Добавляют 20мл воды очищенной. Колбу интенсивно встряхивают для равномерного перемешивания содержимого, затем прибавляют 2-3 капли 1% раствора фенолфталеина.

Полученную суспензию титруют 0,1М раствором натрия гидроксида до появления стойкого слабо-розового окрашивания и достижения $pH = 8,5$, при этом учитывают количество миллилитров 0,1М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование.

Кислотность выражают в градусах Тернера ($^{\circ}C$) и вычисляют по формуле: $T^{\circ} = A * K * 10$, где

A – количество миллилитров 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование 10 мл исследуемой суспензии;

K – поправка к титру 0,1 М раствора натрия гидроксида.

10- объем микробной суспензии.

Интерпритация данных. Значение меньше 100 T° – слабая кислотообразующая активность, выше 100 T° – хорошая кислотообразующая активность.

2.7. Методика определения антагонистической активности штаммов бактерий.

Определение антагонистической активности штаммов бифидобактерий проводили с помощью метода отсроченного антагонизма (Шишин М.В. и др., 2015).

При проведении испытания применяют питательную среду, характерную для роста данного вида бактерий. Мы использовали бифидо-среду производства Оболенск.

Тест-штаммы микроорганизмов, используемые в испытании, получали в лиофилизованном виде из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» с сертификатом соответствия (паспорт штамма). В качестве тест-штаммов использовали *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (FDA 209P), *Escherichia coli* O157.

Лиофилизированные тест-штаммы открывали в асептических условиях пересевали в мясо-пептонный бульон, инкубировали 24 часа при 37С. После этого делали еще один пересев на мясо-пептонную среду. Получали культуральную жидкость тест-штаммов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* в титре 10^8 КОЕ/мл. После этого разводили полученную культуральную жидкость до 10^6 КОЕ/мл, т.к. в организме человека условно-патогенные микроорганизмы содержаться не более чем в 10^6 КОЕ/мл.

На чашки с бифидо-средой методом штриха сеяли исследуемый штамм бифидобактерий, чашки помещали в анаэроустат на 48 часов. После культивирования подсеяли тест-штаммы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Чашки убирали на 24 часа в термостат на 37С. После этого линейкой измеряли зону задержки роста тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов.

Интерпретацию результатов осуществляли по диаметру зон подавления роста тест-штаммов: диаметр зоны подавления роста менее 8 мм –

активность отсутствует, 8–13 мм – слабая активность; 13–18 – средняя активность, более 18 – высокая активность.

2.8. Методика определения антибиотикочувствительности бифидобактерий.

Антибиотикорезистентность бифидобактерий определяли диско-диффузионным методом (Волкова Г.С. и др., 2020), который основан на диффузии антимикробных препаратов из пропитанных бумажных дисков в питательную среду. Для постановки опыта по антибиотикочувствительности применяли набор дисков с 21 антибиотиком производства ЗАО НИЦФ. На чашки Петри с твердой средой Мюллера-Хинтона сплошным газоном высевали суспензию исследуемых штаммов бифидобактерий и одновременно на поверхность агара раскладывали по кругу диски с антибиотиками. Через 48 ч культивирования в анаэробном состоянии при 37 °С фиксировали результаты эксперимента. Интерпретацию результатов устойчивости бифидобактерий к антибиотикам осуществляли по диаметру зон подавления роста штаммов: диаметр зоны подавления роста менее 10 мм – устойчивый, 10–15 мм – малая чувствительность; 15–25 – чувствительный, более 25 – высокая чувствительность.

2.9. Методика определения эмульгирующей активности штаммов бифидобактерий.

Эмульгирующую активность штаммов бифидобактерий определяли методом Голденберга и Купера совместно с Розенбергом (Cooper, Goldenberg, 1987, Rosenberg, 2006). В пробирки объемом 25 мл наливали 5 мл исследуемой культуральной жидкости бифидобактерий и добавляли 5 мл гексадекана. После добавления пробирки активно перемешивали на Vortex на максимальной скорости в течении 2 минут. Пробирки убирали на 24 часа в термостат. После инкубирования по формуле рассчитывали индекс

эмульгирования как отношение объема плотной эмульсии, которая образуется при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объему раствора, умноженному на 100%.

$$E_{24} = V_3 / V * 100\%, \text{ где}$$

E_{24} – индекс эмульгирования, %;

V_3 – объём плотной эмульсии, мл;

V – общий объём раствора, мл.

2.10 Методика определения интенсивности пленкообразования методом связывания красителя.

Для получения биопленок использовали культуру бифидобактерий, выращенную на Оболенской бифидо-среде без агара в анаэроостате в течении 24 часов. Полученную культуральную жидкость разводили до 10^7 степени. Оптическую плотность (OD_{600}) культуры, вносимой в лунку, называют стартовой. В большинстве скорость образования биопленки зависит именно от этого параметра.

Культуру разводят свежей стерильной средой до оптической плотности $OD_{600}=0,01-0,05$ опт. единиц. Для экспресс-тестов, культуру нередко разводят в соотношении 1:100, чтобы нивелировать значение стартовой плотности в эксперименте. Популярным является разведение 1:20, т.к. оно в целом дает приемлемую скорость роста культуры. При использовании нескольких культур или штаммов, стартовую оптическую плотность культуры нормируют, т.е. доводят до одного значения. Инокуляцию и разведение удобнее всего проводить при циркуляции стерильного воздуха в ламинаре. В своем исследовании культуральную жидкость разводили 1:100.

Разведенную в 100 раз культуральную жидкость раскапывали в 48 луночный планшет по 200 мкл. В первый ряд планшета раскапывали чистую питательную среду. В ряд с 2-6 раскапывали исследуемые штаммы. Краевые лунки оставляли пустыми, т.к. у краевых лунок высокий рост обсеменения.

Планшет со средой и культуральной жидкостью накрывали клеящейся пленкой и убирали в термостат в горизонтальном положении на ровную поверхность.

Метод определения интенсивности пленкообразования методом связывания красителя основан на способности красителя кристаллического-фиолетового связываться с клетками и матриксом биопленок (O'Toole and Kolter, 1998). Для элюирования красителя использовали органический краситель генциан фиолетовый. Метод позволяет получить относительные показатели плотности всей биопленки на поверхности подложки.

После культивирования в планшетах из лунок аккуратно отбирали среду с планктонными клетками. Для удаления оставшихся планктонных клеток лунки с биопленками промывали в течение 2-3 минут стерильным буфером PBS (фосфатный буфер pH6-7) в том же объеме, в котором проходило культивирование. Буфер полностью удаляли.

В лунку планшета вносили 600 мкл отфильтрованного 0,1% водного раствора генциан фиолетового (или кристаллического фиолетового). Подсушивали биопленки с красителем в течение 10-15 минут при комнатной температуре.

Удаляли из лунки краситель. Планшеты промывали проточной водой.

Планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу и высушивали. в таком виде планшеты могут храниться 2 и более недели.

В лунки добавляли 95% раствор этанола или смесь этанола – изопропанола (1:1) в объеме 200 мкл. Из лунок отбирали спирт и

производили замеры оптической плотности образцов на приборе Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader («Perkin Elmer», США).

2.11. Методика определения адгезивной способности бифидобактерий.

Адгезивную способность бифидобактерий смотрели по методике Бойцова А.Г. (Бойцова А.Г. и др., 2004).

Для исследования использовали свежую, не более 2-х недель роста культуру бифидобактерий.

Соскоб буккального эпителия делали с внутренней стороны щек с помощью стерильного, деревянного шпателя. Затем, соскоб помещали в цитрат-фосфатный буфер и приступали к исследованию. Цитрат-фосфатный буфер с рН-5,5 готовили путем смешивания 56,85мл раствора динатрия гидрофосфата безводного с 43,15мл раствора лимонной кислоты моногидрата. Фосфатно-цитратный буферный раствор с рН 5,5. Для приготовления раствора динатрия гидрофосфата брали навеску 28,4 г и растворяли в 1 литре воды. Для приготовления раствора лимонной кислоты моногидрата брали навеску 21 г и растворяли в 1 литре воды.

Непосредственно перед началом исследования эпителиальные клетки отмывали цитрат-фосфатным буфером с помощью центрифугирования (1000 об/мин - 5 минут).

После отмывки из осадка готовили контрольные мазки. Для этого на поверхность предметного стекла наносили 1 каплю осадка и распределяли в диск диаметром около 1,5 см. Мазки фиксировали и окрашивали водным раствором метиленового синего. Образец считается пригодным для дальнейшего исследования, если при микроскопии (увеличение $\times 900$) в каждом поле зрения обнаруживают не менее 2-3 эпителиальных клеток.

Для изучения адгезивной активности в пробирку эппендорфа вносят 800 мкл суспензии эпителиальных клеток и 600 мкл суспензии бифидобактерий. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C с периодическим повторным перемешиванием путем переворачивания пробирок.

После инкубации неадсорбированные бактериальные клетки удаляли двукратным отмыванием путем центрифугирования (1000 об/мин в течение 3 минут).

Из осадка готовили мазки, которые после фиксации окрашивали метиленовым синим. При микроскопии препарата подсчитывали количество бактериальных клеток, прикрепившихся к поверхности каждой эпителиальной клетки. Результат выражали в виде среднеарифметического числа лактобактерий на поверхности одного эпителиоцита.

Подсчет проводили не менее чем у 5 клеток эпителиоцитов и, определяли индекс адгезивности по среднему числу адгезировавшихся микроорганизмов, Присваивали балльную оценку: 1 балл - до 30 адгезированных микроорганизмов на одной клетке, 2 балла - 31-60, 3 балла - 61-90, 4 балла - 91-120, 5 баллов - 121 и более, и при количестве адгезированных микроорганизмов в 1-2 балла определяли низкую степень адгезии, в 3 балла - среднюю степень, 4-5 – высокую.

2.12. Методика определения биосовместимости аутоштаммов бифидобактерий между собой.

Биосовместимость выделенных аутоштаммов проверяли методом совместного культивирования на твердых питательных средах (Ковалевская В.С. и др., 2016).

На чашки с твердой питательной средой штрихом сеяли исследуемый штамм бифидобактерий, к нему перпендикулярными штрихами подсеяли

выделенные нами штаммы бифидобактерий. После инкубации в термостате в течении 48 часов доставали чашки и определяли зону задержки роста у подсеянных штаммов.

Глава3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Технологии получения биомассы штаммов бифидобактерий

3.1.1. Работа с маточной культурой производственных штаммов бифидобактерий

Для отработки технологии культивирования бифидобактерий были взяты в качестве производственных штаммы *Bifidobacterium animalis* AC 1248, *Bifidobacterium breve* ATCC 1507, *Bifidobacterium longum* ATCC 1508, полученные из ВКПМ (паспорта штаммов в приложении 1).

Для поддержания маточной культуры, для пересевов, а также выделения бифидобактерий использовали бифидум-среду ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск. Титрацию бифидобактерий проводили на полужидкой биф-среде. Пробирки со средой готовили в день посева. Хранение среды допускается до 2-х недель в холодильнике, но перед применением необходимо среду регенерировать на водяной бане в течение 15 минут с целью удаления кислорода из толщи среды. Чашки с твердой питательной средой готовили за сутки до посева на них. В стерильные чашки Петри разливали биф-агар, когда среда застывала, чашки убирали в анаэроустат на 24 часа, с целью насыщения среды углекислым газом.

Ампулу с лиофилизированной культурой производственных штаммов бифидобактерий вскрывали в асептических условиях над пламенем спиртовки, в ампулу вносили бифидум-среду для растворения лиофилизата. Далее, содержимое ампулы переносили в пробирку с 10мл бифидум-среды (культура 1 пассажа), закрывали ватно-марлевой пробкой и помещали в анаэроустат на 18 часов в термальной комнате на 37 °С.

Через 18 часов открывали анаэроустат, доставали пробирки с культурой бифидобактерий и пересевали содержимое во флаконы с 100 мл бифидум-среды (культура 2 пассажа). Флаконы закрывали ватно-марлевыми пробками и помещали в анаэроустат на 18 часов.

Через 18 часов открывали анаэроустат, доставали флаконы с культурой бифидобактерий, перекрывали резиновыми пробками и убирали в холодильник. Для поддержания маточной культуры пересев делали 1 раз в неделю. Пересевы осуществляли до 5 пассажей. Культуру, пассированную более 5 раз не исследовали.

3.1.2. Хранение маточной культуры

Производственные штаммы бифидобактерий выращивали на жидкой бифидум-среде без добавления агара. Полученную культуральную жидкость раскапывали в эппендорфы. Эппендорфы помещали в центрифугу откручивали при 3000 оборотах в течении 3 минут. Затем пипеткой отбирали надосадочную жидкость, а к осадку клеток бифидобактерий добавляли криопротектор в объеме 0,8 мл. Эппендорфы хранили в криобоксах в морозильной камере при - 82°C. Состав криопротектора: 85мл дистиллированной воды + 5гр лактозы+ 10мл глицерина. Режим стерилизации для криопротектора 110°C 10 минут.

3.1.3. Культивирование производственных штаммов бифидобактерий.

Культивирование бифидобактерий проводили в колбах объемом 10л. В колбу помещали по 7л питательной МРС среды с рН 6,5. Колбы с питательной средой стерилизовали 120°C 30 минут. После охлаждения вносили посевной материал бифидобактерий (2 - 4 пассажа) в количестве 10% от объема среды. Колбу сифонировали и продували углекислым газом (рисунок 1). Время культивирования составляло 24 часа, рН на конец

культивирования достигало значений 4,3. Титр КОЕ культуры бифидобактерий достигал – 10^9 кл/мл.



Рисунок 1 – Культивирование бифидобактерий в колбе

3.1.4. Культивирование бифидобактерий в реакторах объемом 200 литров

Культивирование в реакторах проводили на питательной среде МРС в реакторах объемом 200 литров (рисунок 2). В реактор МРС среду загружали в количестве 170 литров. Стерилизацию среды проводили в реакторе. После охлаждения среды вносили маточную культуру в количестве 14 литров (2 колбы по 7 л каждая). Культивирование проводили без воздуха, предварительно создав над питательной средой газообразную подушку из азота. Весь процесс роста культуры занимал 20 часов. Исходный pH среды 7.0. В процессе культивирования осуществляли перемешивание среды по 10 минут каждый час. Конечный pH культуры достигал 4.26, титр КОЕ бифидобактерий достигал 10^{10} кл/мл.



Рисунок 2 – Культивирование бактерий в реакторах объемом 200 л

3.2. Изучение физиологической активности производственной биомассы бифидобактерий, полученной при жидкостном культивировании в реакторе

3.2.1. Изучение антагонистической активности в отношении условно-патогенных микроорганизмов

Изучение антагонистической активности производственной биомассы штаммов бифидобактерий проводили методом отсроченного антагонизма на агаризованной биф-среде. По истечению срока инкубации проводили измерение зоны задержки роста тест-штаммов патогенов *E.coli* и *S. aureus* под воздействием метаболитов бифидобактерий (рисунок 3).



Рисунок 3 – Контроль тест –штаммов патогенов *E.coli* и *S. aureus* (1); антагонизм производственного штамма *B. animalis* AC 1248 (2); антагонизм производственного штамма *B. longum* ATCC 1508 (3); антагонизм производственного штамма *B. breve* ATCC 1507 (4).

Зона подавления роста условно-патогенных микроорганизмов по всем 3-м штаммам представлена в таблице 3.

Как следует из представленных материалов, бифидобактерии оказывали выраженное антагонистическое действие на рост тест штаммов условных патогенных микроорганизмов: *E. coli* и *S. aureus*.

3.2.2. Изучение кислотообразующей активности биомассы штаммов бифидобактерий по Тернеру

Кислотообразующую активность штаммов бифидобактерий определяли по титруемой кислотности при культивировании бактерий в жидкой питательной среде. Испытание количественного определения

кислотообразующей активности проводили методом кислотного-основного титрования. Данные по кислотообразующей активности представлены в таблице 3.

Таблица 1 – Антагонистическая активность и кислотообразующая активность биомассы штаммов *Bifidobacterium* spp.

промышленные штаммы	Зона задержки роста тест штамма условно-патогенного микроорганизма, мм		Кислотообразующая активность выделенного штамма, °Т
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>B. animalis</i> AC 1248	30±0,5	29±0,5	160
<i>B. longum</i> ATCC 1507	35±0,5	35±0,5	170
<i>B. breve</i> ATCC 1508	19±0,5	20±0,5	170

Все 3 промышленных штамма имели высокий уровень антогенности к УПМ и кислотообразующую активность.

3.2.3. Определение эмульгирующей активности биомассы промышленных штаммов бифидобактерий

Биосурфактанты, являющиеся поверхностно активными веществами (ПАВ), которые образуются многими микроорганизмами, являясь вторичными метаболитами. Различные штаммы лактобактерий одного вида могут обладать разными антимикробными свойствами и механизмами их осуществления. Они способны синтезировать и экскретировать биосурфактанты, классические бактериоцины, бактериоцино-подобные

вещества, белковые соединения, препятствующие адгезии патогенных бактерий и таксономически близких микроорганизмов.

Активность эмульгирования производственной биомассы штаммов бифидобактерий измеряли по методике Розенберга, а также методом Голденберга и Купера (Rosenberg, 2006; Cooper, Goldenberg, 1987).

Результаты исследований представлены на рисунке 4 и в таблице 4.

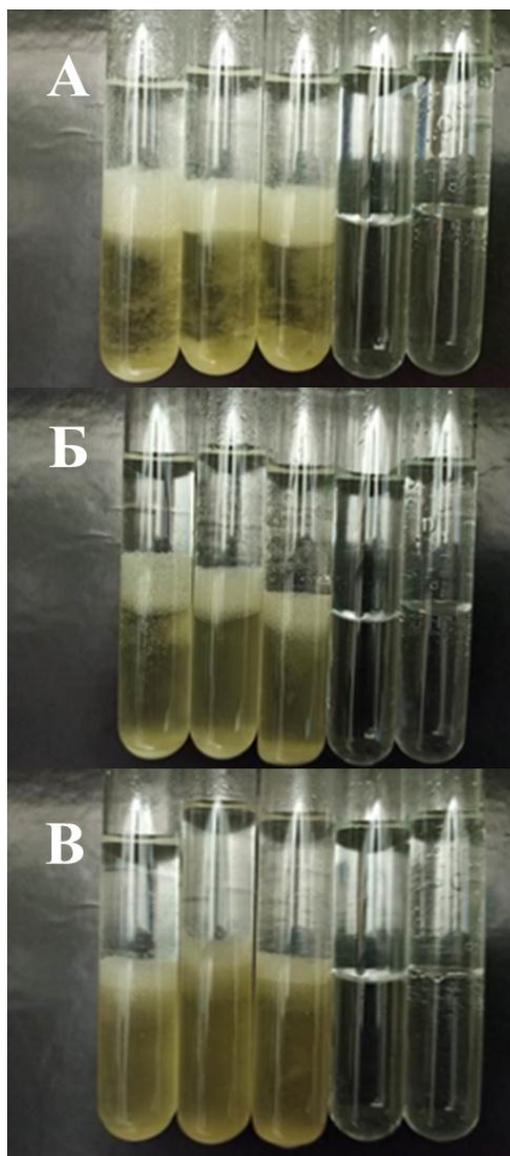


Рисунок 4 – Эмульгирующая активность биомассы промышленных штаммов бифидобактерий: А – *B. longum* ATCC 1508; Б – *B. breve* ATCC 1507; В – *B. animalis* AC 1248.

Таблица 2 – Индекс эмульгирования промышленных *Bifidobacterium* spp.

Исследуемые промышленные штаммы	Эмульгирующая активность штамма, %
Контроль: вода+ гексадекан	0
<i>B. animalis</i> AC 1248	27%
<i>B. longum</i> ATCC 1507	86%
<i>B. breve</i> ATCC 1508	76%

Наилучшей эмульгирующей активностью обладал штамм *B. longum* ATCC 1507.

Наличие эмульгирующей активности свидетельствует о способности бифидобактерий препятствовать образованию биопленок УПМ.

Таким образом, изучение физиологической активности биомассы бифидобактерий показало, что производственные биомассы штаммов бифидобактерий: *B. longum* ATCC 1507, *B. breve* ATCC 1508, *B. animalis* AC 1248 обладают свойствами пробиотических препаратов.

3.2.4. Изучение стабильности титров КОЕ и физиологической активности производственной биомассы штаммов бифидобактерий.

Важным показателем качества биомассы пробиотических штаммов бактерий является ее стабильность в процессе хранения.

Нами проведены исследования по изучению стабильности качества полученной производственной биомассы штаммов бифидобактерий в

течение 6 месяцев хранения: титра КОЕ, антагонистической активности и кислотообразующей активности. Отбор проб биомассы осуществляли каждые 2 месяца хранения биомассы. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 3 – Данные физиологической активности производственной биомассы штаммов бифидобактерий в течение 6 мес хранения

Время хранения	Титр КОЕ Кл/мл	Антагонистическая активность, мм		Кислотообразующая активность, °Т
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
Исходные данные	10 ⁹	20±0,7	21±0,7	110
2 месяца	10 ⁹	20±0,8	21±0,5	110
4 месяца	10 ⁹	20±0,5	21±0,9	110
6 месяцев	10 ⁹	19±0,6	20±0,8	110

Как следует из полученных данных наибольшей стабильностью показателей качества производственной биомассы обладала биомасса штамма *B. animalis* AC 1248.

В связи с этим штамм *B. animalis* AC 1248 они был предложен в качестве основы для получения пробиотического БАДа.

3.3. Изучение свойств БАДа, полученного на основе биомассы штамма бифидобактерий *B. animalis* AC 1248.

БАД на основе культуральной жидкости штамма бифидобактерий *B. animalis* AC 1248 получен путем выращивания штамма в жидкой

питательной среде в реакторе объемом 200литров. БАД содержит в своей основе клетки штамма, продукты его метаболизма и остатки питательной среды.

В асептических условиях культуральная жидкость штамма была разлита в стерильные флаконы по 400 мл.

Проверка свойств полученной биомассы штамма бифидобактерий *B. animalis* AC 1248 показала ее высокую физиологическую активность.

Кислотообразующая активность – 110 °Т, Титр – 10^9 , антагонизм в отношении УПМ таких как *E. coli* и *S. aureus* составляет 20 и 21мм соответственно. Стабильность титра в 10^9 сохраняется в течение 6 месяцев.

БАД на основе производственной биомассы штамма бифидобактерий был зарегистрирован в Гос Реестре и получил Регистрационный номер № АМ.01.01.01.003.R.000172.05.22 от 20.05.2022. ТУ 10.89.19-171-2067271802022 (рисунок 5).



Рисунок 5 – Жидкий пробиотик на основе штамма *B. animalis* AC 1248

Разработка технологии получения биомассы производственных штаммов бифидобактерий позволила перейти к выделению, сохранению и культивированию аутоштаммов бифидобактерий, полученных из кишечного содержимого человека.

3.4. Изучение аутоштаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

3.4.1. Изучение возможности выделения, размножения, сохранения и изучения свойств аутоштаммов *Bifidobacterium* spp.

Началом выделения аутоштаммов из фекалий человека является сдача анализа на дисбактериоз в бактериологической лаборатории.

В ходе проведения стандартного исследования на дисбактериоз проводится высев разведенных физиологическим раствором фекалий из различных разведений на диагностические питательные среды для определения исходных уровней индигенных бактерий: лактобактерий, бифидобактерий, энтеробактерий, энтерококков, стафилококков и сопутствующей микрофлоры, в том числе грибов и условно-патогенных бактерий. Результатом такого исследования является определение количественного соотношения основных представителей микроорганизмов индигенной и транзитной микрофлоры, на основании которого дается заключение о состоянии микробиоценоза кишечника: нормобиоценоз или степень выраженности дисбактериоза.

В ходе проведения данного анализа на дисбактериоз может быть поставлена задача по выделению аутоштаммов индигенной микрофлоры конкретного индивидуума. В этом случае проводится дополнительная работа не предусмотренная протоколом исследования на дисбактериоз.

Используя классическую методику посева на дисбактериоз, выделить аутоштаммы бифидобактерий не удалось. В лучшем случае мы могли определить количество бифидобактерий, но добиться роста на твердых питательных средах отдельных колоний бифидобактерий нам не удавалось. В редких случаях положительный эффект получали при работе с образцами, полученными от детей. В связи с этим было принято решение идти через получение накопительных культур. В ходе исследования нами были

выделены из кишечного содержимого человека 25 аутоштаммов бифидобактерий.

3.4.2. Идентификация *Bifidobacterium* spp.

Все выделенные штаммы были идентифицированы до рода с помощью MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation in Time-Of-Flight mass spectrometers) на приборе VITEK® MS. Определить до вида не представлялось возможным в связи с отсутствием данных в библиотеке масс-спектрометра.

Далее представлены результаты масс-спектрометрического анализа, полученные в ходе исследований аутоштаммов с применением системы VITEK® MS (рисунок 6).

Рисунки отражают результаты MALDI TOF-анализа в форме графиков, ось абсцисс которых отражает значения отношения m/z для каждого пика, а ось ординат - частоту регистрации каждого пика.

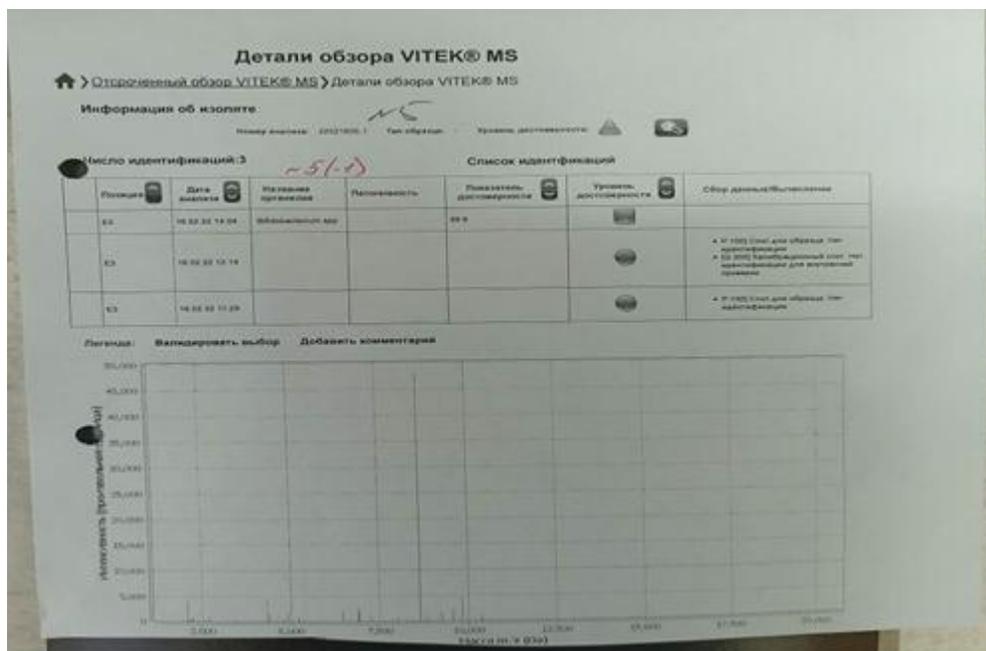


Рисунок 6 – График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK® MS

3.4.3. Культурально-морфологические свойства аутоштаммов *Bifidobacterium* spp.

На агаризованной бифидум-среде в анаэробных условиях клетки бифидобактерий растут в виде чечевицеобразных, гладких, молочного цвета колоний (рисунок 7).

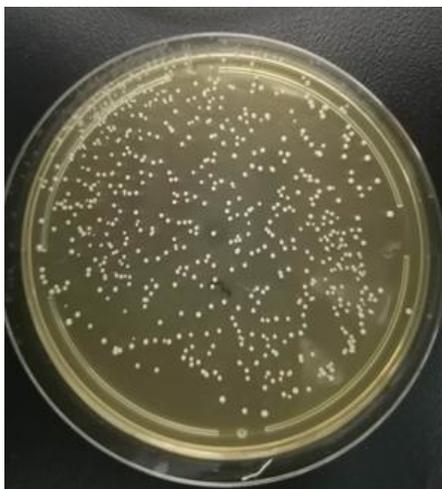


Рисунок 7. Рост культуры *Bifidobacterium* spp. на чашках с бифидум-средой

Из характерных колоний производят микроскопирование. В мазках клеток бифидобактерий, окрашенных по Граму, обнаруживаются грамм-положительные палочки, представленные под микроскопом в виде булавы, рогаток, веточек (рисунок 8).

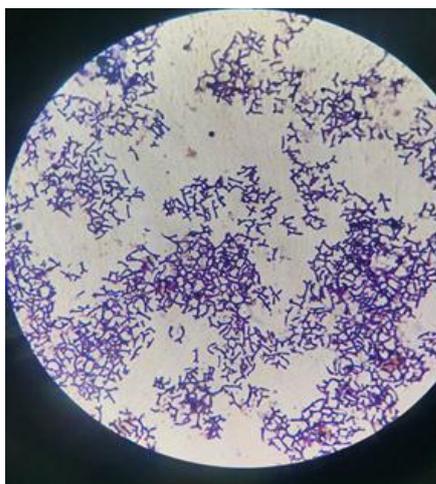


Рисунок 8 – Морфология клеток *Bifidobacterium* spp. под микроскопом

Для последующей работы были отобраны 20 аутоштаммов, выделенных нами бифидобактерий, с целью дальнейшего изучения их свойств.

Отбор штаммов проводили по их способности расти в полужидкой питательной бифидум - среде производства Оболенск в титре не менее 10^8 кЛ/мл. Так как бифидобактерии строгие анаэробы, в кишечнике обитают в присутствии смеси газов, при выделении и размножении культуры очень сложно адаптировать их к условиям выращивания и к среде с большим насыщением кислорода, чем в условиях их естественного обитания (в кишечнике). При этом часто происходила потеря уже выделенных колоний бифидобактерий, прошедших генетическую идентификацию при последующих пересевах на твердых и жидких питательных средах, даже в условиях анаэротата. В результате из 25 выделенных культур для дальнейшего исследования было отобрано 20.

3.4.4. Определение антагонистической и кислотообразующей активности выделенных аутоштаммов

Уровень физиологической активности аутоштаммов бифидобактерий кроме способности к росту на искусственных питательных средах в условиях анаэротата, оценивали также по уровню антагонистической активности к условно-патогенным бактериям (*E.coli* и *S. aureus*) а также по уровню кислотообразующей активности и адгезивной активности к эпителиоцитам щеки донора аутоштамма. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Антагонистическая активность и кислотообразующая активность аутоштаммов *Bifidobacterium* spp.

Условная нумерация аутоштаммов бифидобактерий	Зона задержки роста тест штамма УПМ, мм		Кислотообразующая активность, °Т	Адгезия
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		
1	20±0,5	20±0,5	197	4
2	17±0,5	15±0,5	140	4
3	19±0,5	20±0,5	170	4
4	17±0,5	18±0,5	160	5
5	16±0,5	15±0,5	175	3
6	15±0,5	19±0,5	170	4
7	16±0,5	17±0,5	180	3
8	14±0,5	17±0,5	140	3
9	20±0,5	21±0,5	150	5
10	14±0,5	16±0,5	125	4
11	19±0,5	19±0,5	150	5
12	15±0,5	14±0,5	150	3
13	21±0,5	21±0,5	160	4
14	18±0,5	16±0,5	120	4
15	18±0,5	15±0,5	130	4
16	17±0,5	14±0,5	125	3
17	16±0,5	15±0,5	135	3
18	15±0,5	18±0,5	120	3
19	13±0,5	12±0,5	110	3

20	13±0,5	12±0,5	115	3
----	--------	--------	-----	---

Сравнительное изучение антагонистической активности аутоштаммов бифидобактерий. Антагонистическую активность аутоштаммов бифидобактерий исследовали методом отсроченного антагонизма, используя метод штрихов. К выросшей культуре аутоштаммов подсевали тест штаммы условно-патогенных бактерий, контролем служило выращивание тест-штаммов на чашке без бифидобактерий. Результаты исследования представлены на рисунке 9.

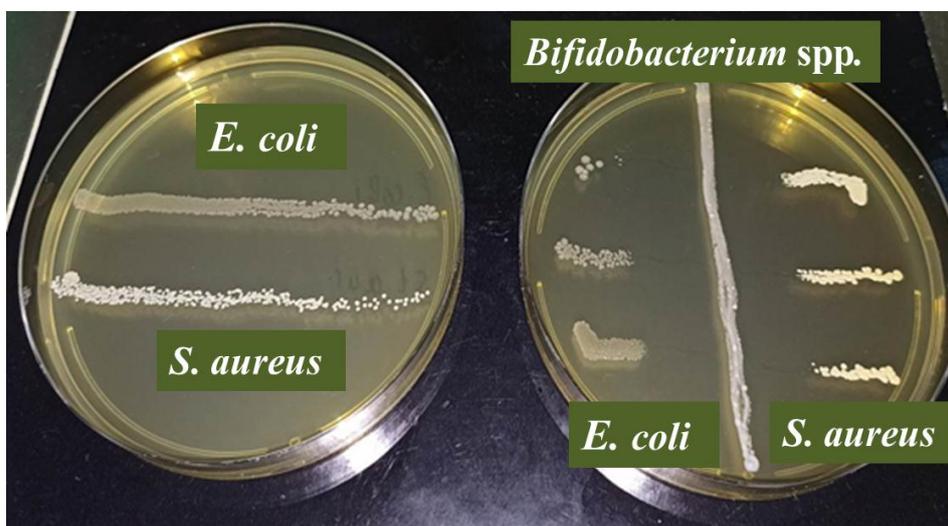


Рисунок 9 – Исследование антагонизма аутоштаммов *Bifidobacterium spp.*

Уровень антагонистической активности аутоштаммов бифидобактерий значительно различался между разными аутоштаммами.

Провели сравнительный анализ уровня антагонистической активности 20 аутоштаммов бифидобактерий (рисунок 10), представленный на диаграмме.

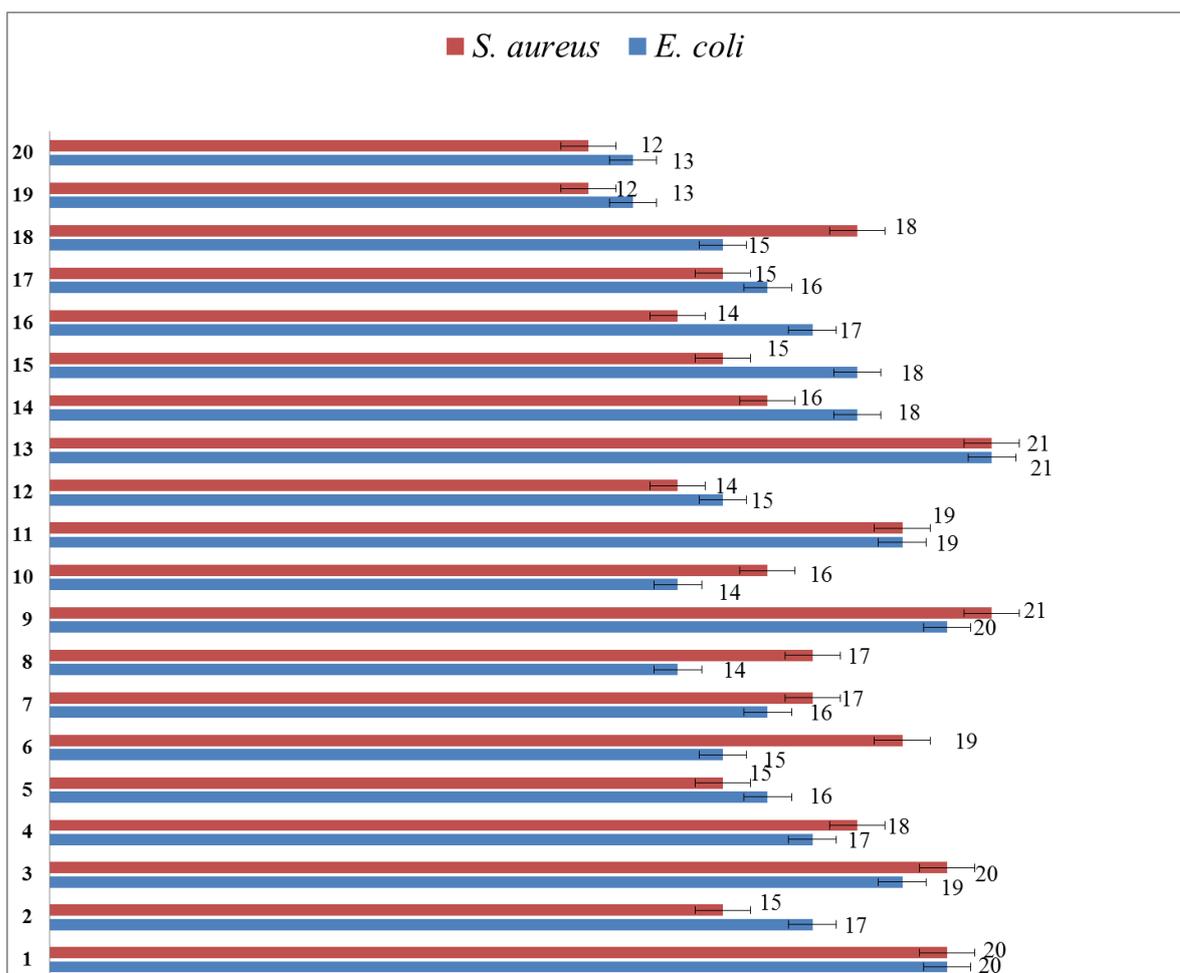


Рисунок 10 – Антагонистическая активность выделенных аутоштаммов *Bifidobacterium spp.*

Выделенные штаммы *Bifidobacterium spp.* под условными номерами 19 и 20 обладали слабой антагонистической активностью в отношении *E. coli* и *S. aureus*, т.к. зона задержки роста УПМ составила 13 и 12 мм. Штаммы *Bifidobacterium spp.* 1, 3, 9, 11 и 13 обладали высокой антагонистической активностью. Зона задержки роста УПМ составила более 19 мм. Штаммы *Bifidobacterium spp.* 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 и 18 обладали средней антагонистической активностью, значение зон задержки роста УПМ составляла от 12-18 мм.

Сравнительное изучение кислотообразующей активности аутоштаммов бифидобактерий. Исследование кислотообразующей

активности аутоштаммов проводили методом кислотно-основного титрования (Бегунова и др., 2020) (рисунок 11).



Рисунок 11 – Измерение кислотообразующей активности, выделенных аутоштаммов *Bifidobacterium* spp.

Сравнительная характеристика кислотообразования аутоштаммов бифидобактерий представлена на диаграмме (рисунок 12).

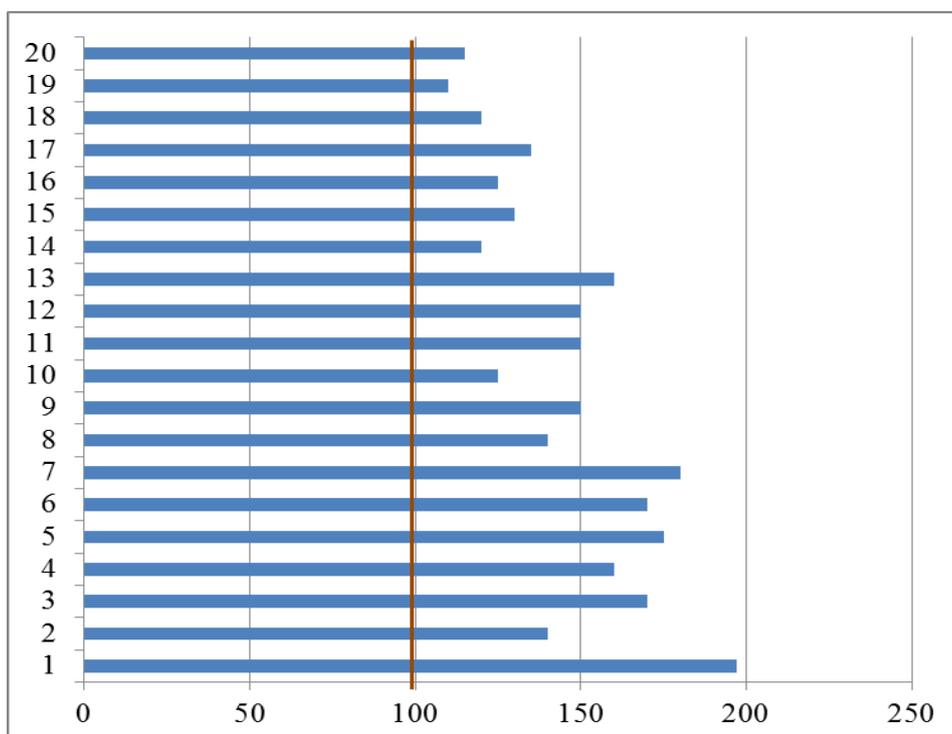


Рисунок 12 – Кислотообразующая активность аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. (более 100.0 °Т – высокая активность)

Все выделенные штаммы *Bifidobacterium* spp. обладали хорошей кислотообразующей активностью. Все значения были выше 100°Т. Минимальная кислотообразующая активность 115°Т была у штамма *Bifidobacterium* spp. №19, максимальное значение 190°Т было у штамма *Bifidobacterium* spp. №1.

3.4.5. Определение способности адгезии к буккальному эпителию щеки человека.

Адгезивную способность к буккальному эпителию щеки человека-донора аутоштаммов, определяли по методике Бойцова А.Г. (2004).

Смесь аутоштаммов бифидобактерий в концентрации 1×10^6 кл/мл инкубировали с концентратом щечного эпителия человека, последующей отмывкой неадгезированных клеток бифидобактерий, Из полученного комплекса эпителиоцитов и бифидобактерий делали мазки для микроскопии, фиксировали над пламенем спиртовки и окрашивали метиленовым синим. Под микроскопом с иммерсионным объективом производили подсчет количества адгезированных клеток бифидобактерий к 5 клеткам буккального эпителия человека-донора бифидобактерий (рисунок 13).

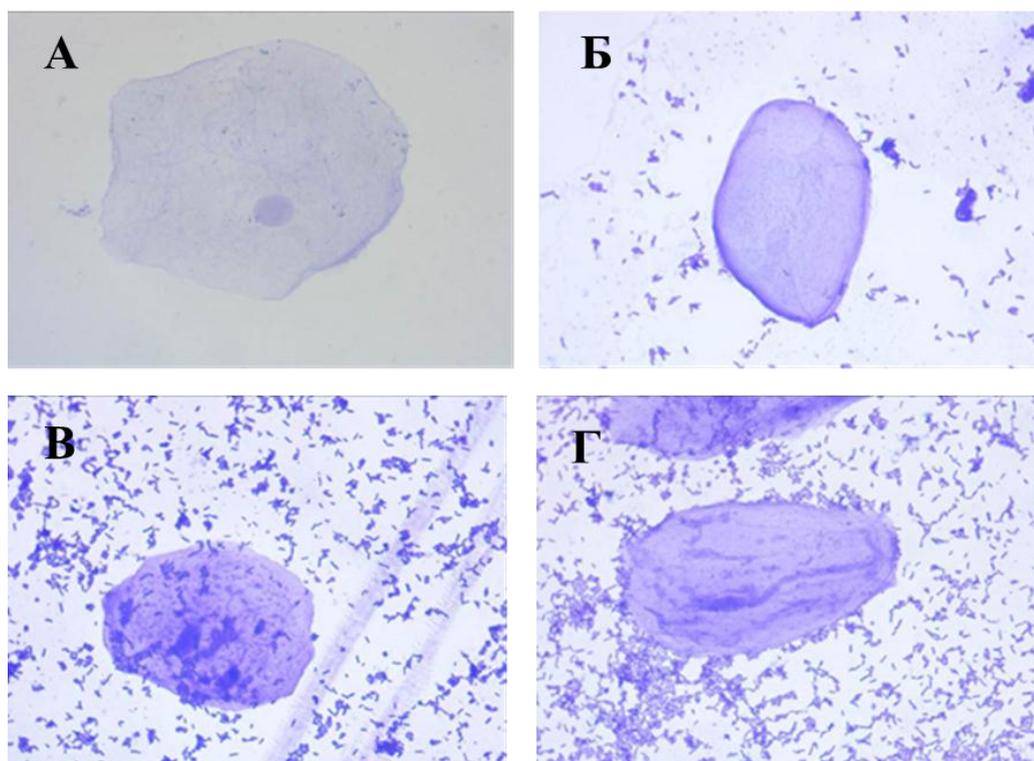


Рисунок 13– Адгезия *Bifidobacterium* spp. к буккальному эпителию: А – буккальный эпителий; Б – вариант плохой адгезии менее 3 баллов; В – вариант средней адгезии (3 балла); Г – вариант хорошей адгезии (5 баллов) у штамма *Bifidobacterium* spp. №3

В ходе проведенного исследования мы установили, что все выделенные штаммы бифидобактерий обладали средней (3 балла) и высокой адгезией (4-5 баллов) к буккальному эпителию человека, от которого были выделены штаммы бифидобактерий.

В ходе выше приведенных исследований нами были отобраны 5 штаммов для дальнейшего исследования. *Bifidobacterium* spp. № 1, 3, 9, 11 и 13, так как эти штаммы обладали хорошей кислотообразующей активностью и высоким уровнем антагонизма к УПМ.

3.4.6. Определение антибиотикочувствительности аутоштаммов *Bifidobacterium* spp.

Антибиотикоустойчивость аутоштаммов бифидобактерий определяли методом оценки диаметра зон подавления роста с помощью дисков с антибиотиками (НИЦФ СПб по ТУ 9398-001-39484474-2000) (рисунки 14 и 15). Данные проведенных исследований представлены в таблице 7.

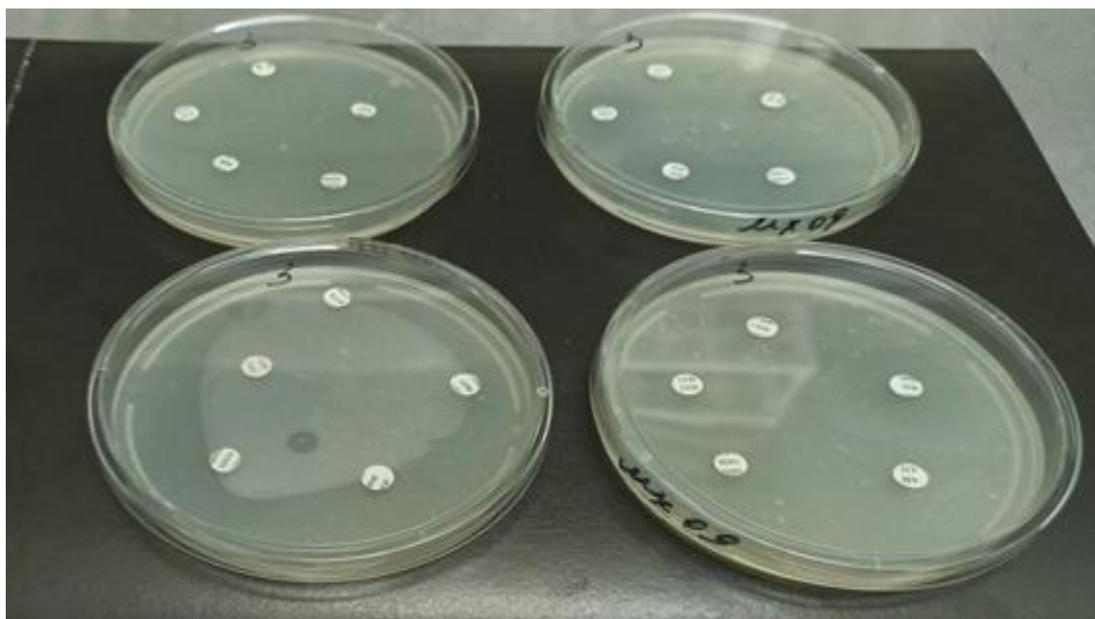


Рисунок 14 – Антибиотикочувствительность аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. № 3

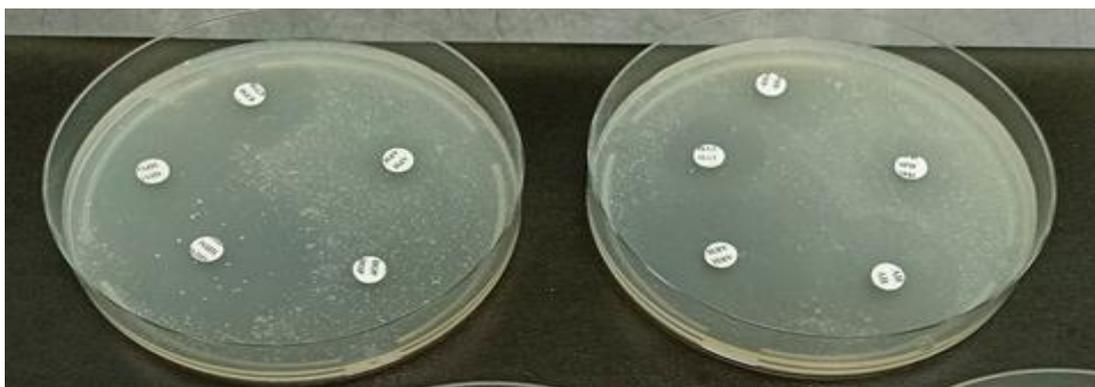


Рисунок 15 – Антибиотикочувствительность аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. № 11

Таблица 7 – Антибиотикочувствительность выделенных аутоштаммов бифидобактерий.

Антибиотик	Зона задержки роста штамма бифидобактерий, мм				
	№ 1	№ 3	№ 9	№ 11	№ 13
Ванкомицин	0	0	0	0	0
Меропенем	0	0	0	0	0
Амикацин	0	0	0	0	0
Флоксацин	0	0	0	0	0
Рифампицин	0	0	0	0	0
Тетрациклин	0	0	0	0	0
Норфлоксацин	0	0	0	0	0
Левифлоксацин	0	0	0	0	0
Эритромицин	0	20±0,5	15±0,5	0	0
Кларитромицин	25±0,5	0	0	0	0
Азитромицин	0	0	0	0	0
Гентамицин	0	0	0	17±0,5	0
Цефтриаксон	30±0,5	0	30±0,5	0	0
Цефтазидим	17±0,5	0	0	0	15±0,5
Цефотаксим	0	0	0	0	20±0,5
Цефепим	18±0,5	0	25±0,5	0	0
Имипенем	0	0	0	0	20±0,5
Амоксициллин	0	0	0	0	0
Ампициллин	0	25±0,5	0	0	0
Бензилпенициллин	0	25±0,5	0	25±0,5	0

Левомецетин	0	15±0,5	17±0,5	25±0,5	0
-------------	---	--------	--------	--------	---

Все исследуемые штаммы обладали характерной устойчивостью к ванкомицину, меропенему, амикацину, флоксацину, рифампицину, тетрациклину, норфлоксацину, левофлоксацину, азитромицину, амоксициллину.

Аутоштаммы бифидобактерий также проявляли чувствительность к антибиотикам определенных групп: эритромицину, кларитромицину, гентамицину, цефтриаксону, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, имипенему, ампициллину, бензилпенициллину, левомецетину в зоне задержки роста 15-25 мм.

Bifidobacterium spp. №1 чувствителен к цефтриаксону, кларитромицину. *Bifidobacterium* spp. №3 чувствителен к эритромицину, ампициллину, бензилпенициллину, левомецетину в зоне от 17-30 мм. *Bifidobacterium* spp. №9 чувствителен к цефтриаксону, цефепиму, левомецетину в зоне от 15-30 мм. *Bifidobacterium* spp. №11 чувствителен к гентамицину, бензилпенициллину, левомецетину в зоне от 17-30 мм. *Bifidobacterium* spp. №13 чувствителен к цефтазидиму, цефотаксиму, имипенему от 15-20 мм.

3.4.7. Определение способности к биопленкообразованию на инертных носителях.

Отобранные штаммы *Bifidobacterium* spp. После нанесения образцов в 48 луночные планшеты, инкубировали 3 дня, 7 дней и 14 дней. Отмывали фосфатным буфером pH 6,5 2 раза. Прокрашивали генцианфиолетовым, подсушивали и измеряли относительную оптическую плотность (таблица 8, рисунок 16).

Таблица 8 – Относительная оптическая плотность биопленок штаммов *Bifidobacterium* spp. образовавшихся в течение 3, 7 и 14 дней.

Исследуемый штамм бифидобактерий	Оптическая плотность		
	3 дня	1 неделя	2 недели
Контроль	0,147	0,140	0,142
1	0,2986	0,339	0,4922
3	0,3628	0,385	0,7444
9	0,2965	0,318	0,4118
11	0,3184	0,3003	0,3273
13	0,3306	0,3450	0,4112

Изменение интенсивности пленкообразования аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. представлено на диаграмме (рисунок 16).

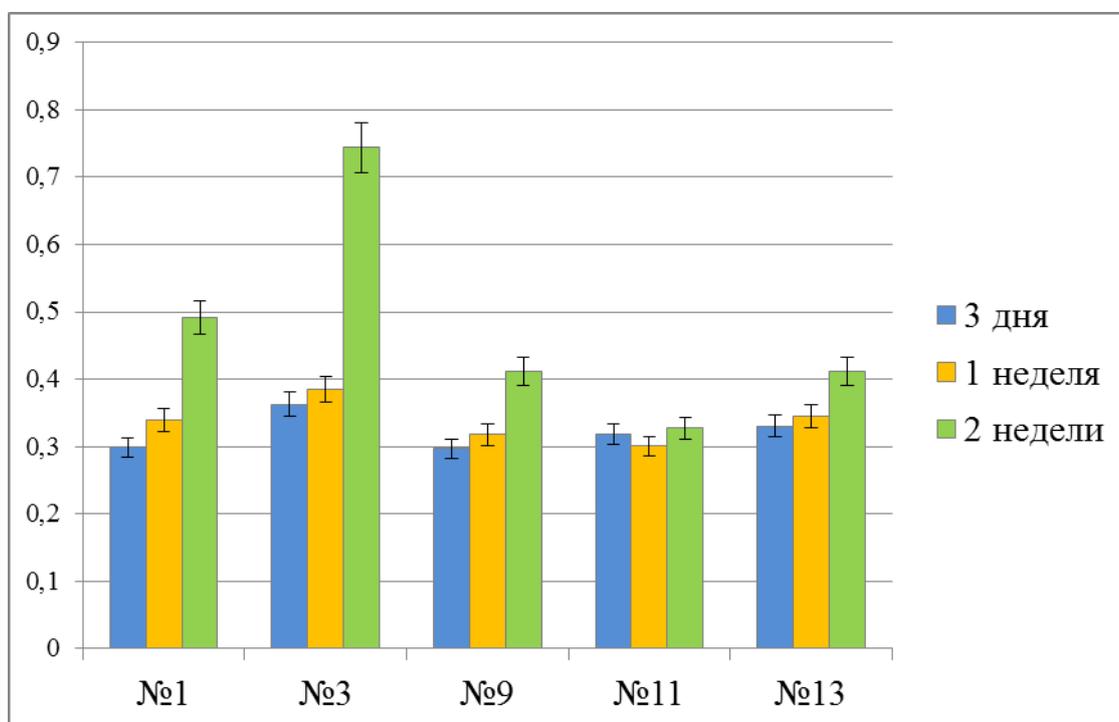


Рисунок 17 (нумерацию надо проставить правильно) – Сравнение изменений в относительной биомассе биопленок аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. в 3-х периодах

По результатам все исследуемые аутоштаммы *Bifidobacterium* spp. обладают способностью к пленкообразованию. Интенсивность нарастания пленки возрастает в зависимости от времени (3дня-7дней-14 дней). Аутоштаммы *Bifidobacterium* spp. №1 и 3 обладали наиболее высокой пленкообразующей способностью.

3.4.8. Определение биосовместимости выделенных аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. между собой.

Для создания комплексных пробиотических препаратов проанализирована биосовместимость культур выделенных штаммов *Bifidobacterium* spp. № 1, 3, 9, 11 и 13 между собой.

Биосовместимость определяли путем совместного культивирования на твердой питательной среде, путем подсева всех штаммов друг к другу. Данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Биосовместимость выделенных штаммов *Bifidobacterium* spp.

Наименование штамма <i>Bifidobacterium</i> spp.	Наименование штамма <i>Bifidobacterium</i> spp.				
	№ 1	№ 3	№ 9	№ 11	№ 13
№ 1		+	+	+	+
№ 3	+		+	+	+
№ 9	+	+		+	+
№ 11	+	+	+		+

№ 13	+	+	+	+	
------	---	---	---	---	--

Из приведенных выше данных следует, что все комбинации исследуемых штаммов являются биосовместимыми, вследствие чего можно будет рассматривать варианты для совместного культивирования и разработки в дальнейшем комбинированных пробиотических препаратов из разных штаммов бифидобактерий.

На рисунках 17 и 18 отображены результаты совместного культивирования аутоштаммов *Bifidobacterium* spp.

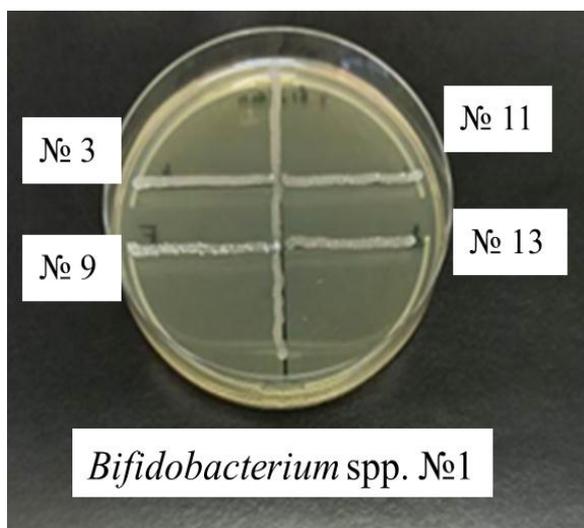
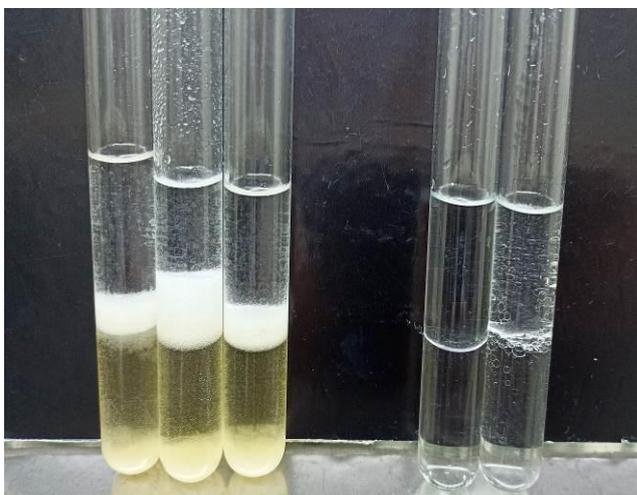


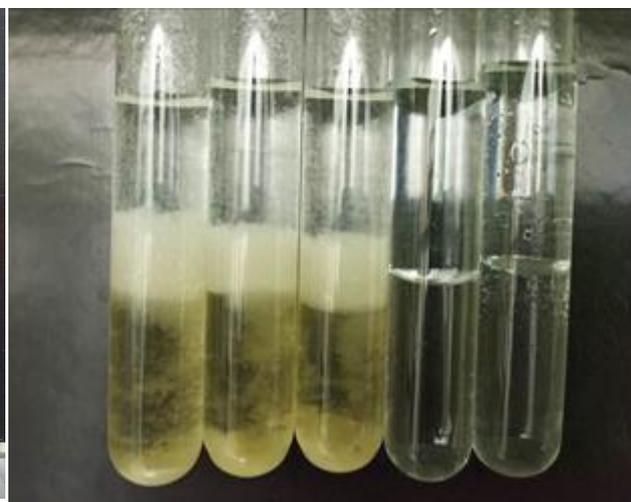
Рисунок 17 – Совместное культивирование выделенных аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. №1

Таблица 10 – Индекс эмульгирования аутоштаммов *Bifidobacterium* spp.

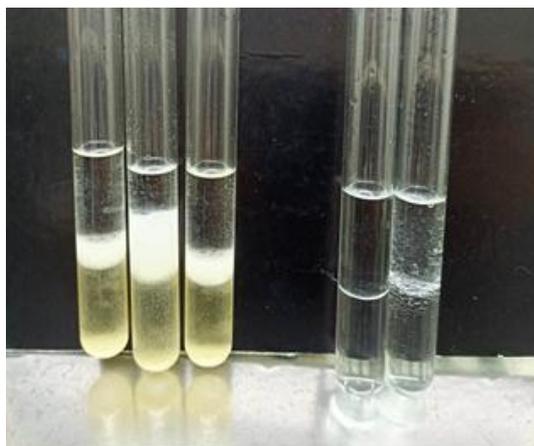
Исследуемый штамм <i>Bifidobacterium</i> spp.	Эмульгирующая активность штамма, %
Контроль – вода+ гексадекан	0
<i>Bifidobacterium</i> spp. №1	12,3%
<i>Bifidobacterium</i> spp. №3	11,4%
<i>Bifidobacterium</i> spp. №9	8.0%
<i>Bifidobacterium</i> spp. №11	11,3%
<i>Bifidobacterium</i> spp. №13	11,9%



А



Б



В

Рисунок 18 – Эмульгирующие активности *Bifidobacterium* spp.: А – *Bifidobacterium* spp. №1; Б– *Bifidobacterium* spp. №3; В – *Bifidobacterium* spp. № 13

На рисунках слева – определение эмульгирующей активности исследуемого штамма бактерий в 3-х повторности, справа – контроль вода с гексадеканом до перемешивания и после перемешивания.

В результате, все исследуемые штаммы бифидобактерий обладали эмульгирующей активностью в пределах от 8,0% до 12,3%. Это свойство позволяет штаммам бифидобактерий препятствовать внедрению УПМ в кишечную биопленку, что является важным критерием отбора штаммов для производства на их основе препаратов-пробиотиков. Данные штаммы бифидобактерий также могут быть рассмотрены в качестве продуцентов биосурфактантов в промышленном производстве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время одним из наиболее доступных и эффективных способов экологической реабилитации микробиоценоза кишечника являются прием пробиотиков, оказывающих многофакторное положительное воздействие на организм человека. Анализ литературных данных показал, что пробиотики на основе производственных штаммов нормофлоры кишечника человека, в том числе и бифидобактерий обладают часто временной или сомнительной эффективностью. Положительный эффект пробиотиков, созданных на основе микроорганизмов, зачастую выделенных из нормальной кишечной микрофлоры, даже при длительном применении, носит транзиторный характер, а то и вовсе отсутствует. Доказано, что наиболее эффективное и быстрое восстановление микробиоценоза кишечника происходит при применении аутоштаммов основных видов нормобиоценоза - бифидо- и лактобактерий с восстановленной физиологической активностью. Персонафицированная медицина для длительного сохранения здоровья человека в качестве наиболее эффективного проекта предлагает повсеместное создание банков естественных микробиоценозов каждого отдельного человека.

В ходе исследования проведена разработка технологии получения биомассы штаммов бифидобактерий. Для отработки технологии культивирования бифидобактерий были взяты в качестве производственных штаммы *B. animalis* AC 1248, *B. breve* ATCC 1507, *B. longum* ATCC 1508, полученные из ВКПМ.

Разработанная технология культивирования бифидобактерий (подбор питательных сред и технологических параметров культивирования) позволила получить биомассу бифидобактерий высокого качества, обладающую свойствами пробиотических препаратов.

Высокий уровень качества полученной биомассы штаммы *B. animalis* AC 1248 позволил создать на ее основе пробиотический БАД, который был зарегистрирован в Гос Реестре и получил Регистрационный номер № АМ.01.01.01.003.R.000172.05.22 от 20.05.2022. ТУ 10.89.19-171-2067271802022.

Разработка технологии получения биомассы производственных штаммов бифидобактерий позволила перейти к работе с аутоштаммами бифидобактерий, выделенными из кишечного содержимого человека: выделению, идентификации, сохранению и культивированию (получению биомассы аутоштамма).

В ходе проведенных исследований была разработана технология выделения аутоштаммов бифидобактерий, предварительное их типирование по культурально-морфологическим признакам (форме колоний и микроскопированию), генетическое подтверждение принадлежности к роду *Bifidobacterium*, условия сохранения штаммов, получение биомассы выделенных штаммов бифидобактерий и изучение их физиологической активности. В результате выделено и отобрано 5 наиболее перспективных вариантов аутоштаммов бифидобактерий для создания на их основе пробиотических препаратов, как моноштаммовых, так и комплексных.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология получения биомассы 3-х промышленных штаммов бифидобактерий. Технология производства пробиотического продукта на основе штамма *Bifidobacterium animalis* включает в себя подбор питательной среды, скорость и интенсивность перемешивания, температура и длительность культивирования.

2. Проведен подбор критериев оценки качества производственной биомассы бифидобактерий, полученной при жидкостном культивировании в реакторе: кислотообразующая активность, антагонизм в отношении штаммов условно-патогенных микроорганизмов, определение титр/КОЕ на твердой и полужидкой питательной среде.

3. Выделены 25 аутоштаммов чистых культур, которые с помощью микробиологических исследований и масс-спектрометрии были идентифицированы до рода. Отработаны методы культивирования и сохранения аутоштаммов бактерий рода *Bifidobacterium*, полученных из кишечника человека

4. По результатам оценки биологических свойств выделенных штаммов наиболее эффективными и перспективными явились аутоштаммы *Bifidobacterium* spp. № 1, 3, 9, 11 и 13, которые обладали высоким антагонизмом в отношении штаммов условно-патогенных микроорганизмов, хорошей кислотообразующей способностью, способностью к пленкообразованию.

5. Собрана коллекция из 5 аутоштаммов *Bifidobacterium* spp. № 1, 3, 9, 11 и 13 для создания на их основе пробиотических препаратов, как моноштаммовых, так и комплексных.

Список использованной литературы

1. Awasti N., Tomar S.K., Pophaly S.D., Poonam V.K., Singh T.P., Anand S. Пробиотическая и функциональная характеристика бифидобактерий индийского происхождения человека . J. Приложение. Микробиол. 2015. 120, 1021–1032.
2. Бунешова В.; Влкова Е.; Рада В.; Киллер Дж.; Мусилова С. Бифидобактерии из желудочно -кишечного тракта животных: различия и сходства. Благотворно. Микробы . 2014, 5. 377-388.
3. Delcenserie V.; Gavini F.; Beerens H.; Tresse O.; Franssen C.; Daube G. Описание нового вида *Bifidobacterium crudilactis* sp. Nov., выделенного из сырого молока и сырых молочных сыров Система. Приложение. Микробиол .2007.с. 30., 381–389.
4. Biavati B., Vescovo M., Torriani V. Bifidobacteris: history, ecology, physiology and applications./Ann Microbiol. 2000. V. 50. P. 117-131.
5. Nebra Y., Blanch A.R. A New Selective Medium for Bifidobacterium. / Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 5173-5176.
6. Амерханова А.М. Морфологическая изменчивость микроорганизмов рода *Bifidobacterium* // Здоровье населения и среда обитания. 2012. №12. С.33-35.
7. Exterkate F.A., Vresen G.F.J., Veerkamp J.H. Biochemical changes in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* after cell wall inhibition. III Morphological structure and osmotic properties of the protoplasts and membrane composition //Biochim. et biophys. Acta.1970. V.219.P.141-154.
8. Домотенко В.М., Шепелен А.П. Бифидум – среда для выделения и культивирования бифидумбактерий./Инфекция и иммунитет. 2014. Т.4.№3. С.279-283.
9. Бондаренко В.М. По поводу нового подхода к классификации фармакопейных лекарственных пробиотических препаратов, биологически

активных добавок к пище и продуктов функционального питания./ Фарматека. 2007. №2. С.62-64.

10. Khaskheli G., Zuo F., Yu R., Chen S. Everexpression of small heat shock protein enhances heat- and salt-stress tolerance of *Bifidobacterium longum* NCC2705. / *Curr. Microbiol.* 2015. V. 71. P. 8-15.

11. Simpson P.J., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. / *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 401-406.

12. Talwalkal A., Kailasapathy K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L.acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. / *Curr. Issues Intest. Micribiol.* 2004. V. 5. P. 1-8.

13. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования . М.: Наука, 1975. 384с.

14. Меркулова Л.В., Ерошкина О.Е., Казакова И.В. Полиморфизм бактерий рода *Bifidobacterium* // Молочная промышленность, 2012. №9. С.39.

15. Алешкин В.А., Амерханова А.М., Поспелова И.И., Пожалостина А.В. Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования // Молочная промышленность. 2003. №1. С.59-61.

16.Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности сельском хозяйстве: сб.науч. тр./ Министерство здравоохранения РСФСР, Москов. Науч.-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Москва. 1986. 207с.

17. Poupard J., Husain I., Norris R. Biology of the bifidobacteria / *Bacteriol. Rev.* 1973. V. 37. P. 136-165.

18. Winslow C.E.A., Broadhurst J., Buchanan R.E., Krumweide C., Rogers L.A., Smith G.H. The families and genera of the bacteria: reliminary report of the

committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. / J. Bacteriol. 1917. V. 2. P. 505-566

19. Prasanna P, Grandison A., Charalampopoulos D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. / Food Res. Int. 2014. V. 55. P. 247-262.

20. Dehnert J. Untersuchungen über die Gram positive Stuhlflora. / Brustmilchkinder. Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infectiionskr. 1957. S. 66-79

21. Драчева Л.В., Короткова Е.И., Лукина А.Н. Антиоксидантные свойства пробиотиков // Молочная промышленность. 2006. №12. С.62-63.

22. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. Киев: Эксперт ЛТД. 2005. 326с.

23. Рябая Н.Е., Головнева Н.А., Самарцев А.А. Селекция бифидобактерий по устойчивости к кислотному стрессу. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 7. Минск. 2015. с.57-68.

23. Токаев Э.С., Ганина В.И., Багдасарян А.С. Поведение антагонистически активных штаммов бифидобактерий в процессе хранения синбиотического комплекса // Молочная промышленность. 2006. №9. С.33-34.

24. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. М. Пищевая промышленность. 1975. 255с.

25. Артюхова С.И., Поночевная Г.С., Свешников А.А. Значение исследований природной устойчивости молочнокислых бактерий и

бифидобактерий к антибиотикам при разработке новых видов биопродуктов //Международный журнал экспериментального образования . 2014. №8. С.96-97.

26. Жиленкова О.Г. Селекция производственно перспективных штаммов бифидобактерий, выделенных от детей. Автореф. дис. на соискание уч. степ. канд.биол. наук . Барнаул, 2011. 30с.

27. Кожухметов С.С. Бифидобактерии и их про- и пребиотические свойства // Молочная промышленность. 2014. №10. С.57.

28.Сидоренко А.В., Новик Г.И., Характеристика антибиотикоустойчивости коллекционных, пробиотических и выделенных из кишечника штаммов бифидобактерий //Труды БГУ. 2013 т.8,часть1.С.144-151.

29. Duranti. S., Lugli. G.A., Napoli. S., Anzalone. R., Milani. C., Mancabelli. L., Alessandri.G., Turroni.F., Ossiprandi. M.C., Van Sinderen. D. Характеристика филогенетического разнообразия пяти новых видов, принадлежащих к роду *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium castoris* sp. ноябрь., *Bifidobacterium callimiconis* sp. ноябрь., *Bifidobacterium goeldii* sp. ноябрь., *Bifidobacterium samirii* sp. ноябрь. и *Bifidobacterium dolichotidis* sp. ноябрь. *Int. J. Syst. Эвол. Микробиол.* 2019. С.69,

30. Гудков А.В.Производство молочных продуктов с использованием бифидобактерий / [А. В. Гудков, Т. М. Эрвольдер, М. Я. Гудкова]. - М. : ЦНИИТЭИмясомолпром, 1981. - 8 с.; 21 см.

31. Oikarinen S, Heinonen S, Karppinen S, Mättö J, Adlercreutz H, Routanen K и Mutanen M: Уровни энтеролактона или кишечных бифидобактерий в плазме не объясняют образование аденомы у мышей с

множественной неоплазией кишечника (Min), которых кормили двумя разными типами фракций ржаных отрубей. *Br J Nutr.* 90:119-125. 2003.

32. Бинделс Л.Б., Нейринк А.М., Салазар Н., Таминиау Б., Друарт С., Муччиоли Г.Г., Франсуа Е., Блекер С., Ришель А., Даубе Г. и др.: Неперевариваемые олигосахариды модулируют кишечную микробиоту для контроля развития лейкемии и связанной с ней кахексии у мышей. *PLoS One.* 10: e01310092015.

33. Сиван А., Корралес Л., Хьюберт Н., Уильямс Дж.Б., Акино-Майклс К., Эрли З.М., Беньямин Ф.В., Лей Ю.М., Джабри Б., Алегри Мл. и др.: Комменсальная бифидобактерия способствует противоопухолевому иммунитету и повышает эффективность против PD-L1. *Наука.* 350:1084–1089. 2015.

34. Боттачини Ф., ван Синдерен Д. и Вентура М.: Омики бифидобактерий: исследования и понимание их деятельности, способствующей укреплению здоровья. *Biochem J.* 474:4137-4152. 2017.

35. Алмейда К.С., Лорена С.Л., Паван К.Р., Акасака Х.М., Мескита М.А., 2012. Положительный эффект от длительного употребления пробиотической комбинации *Lactobacillus casei* Shirota и *Bifidobacterium breve* Yakult может сохраняться после прекращения терапии у пациентов с непереносимостью лактозы. *Nutr Clin Pract* 27:247-251.

36. Он Т., Прибе М.Г., Чжун У, Хуан К., Хармсен Х.М., Раангс Г.К., Антуан Дж.М., Веллинг Г.В., Вонк Р.Дж. 2008. Влияние добавок йогурта и бифидобактерий на микробиоту толстой кишки у лиц с непереносимостью лактозы. *J Приложение Microbiol* 104:595-604.

37. Вейцман З., Асли Г., Альшейх А. 2005. Влияние пробиотической детской смеси на инфекции в детских учреждениях: сравнение двух пробиотических агентов. *Педиатрия* 115:5-9.

38. Plummer S, Weaver MA, Harris JC, Dee P, Hunter J. 2004. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Int Microbiol* 7:59–62.

39. Agrawal M, Aroniadis OC, Brandt LJ, Kelly C, Freeman S, Surawicz C, Broussard E, Stollman N, Giovanelli A, Smith B, Yen E, Trivedi A, Hubble L, Kao D, Borody T, Finlayson S, Ray A, Smith R. 2016. The long-term efficacy and safety of fecal microbiota transplant for recurrent, severe, and complicated *Clostridium difficile* infection in 146 elderly individuals. *J Clin Gastroenterol* 50:403–407.

40. Мики К., Урита У, Исикава Ф., Иино Т., Сибахара-Сон Х., Акахоши Р., Мидзусава С., Ноуз А, Нозаки Д., Хирано К., Нонака С, Екокура Т. 2007. Влияние кисломолочных ферментов *Bifidobacterium bifidum* на уровень *Helicobacter pylori* и сывороточного пепсиногена у людей. *J Dairy Sci* 90:2630-2640.

41. Роллер М., Ключ Ю., Коллинз К., Речкеммер Г., Ватцл Б. 2007. Потребление пребиотика инулина, обогащенного олигофруктозой, в сочетании с пробиотиками *Lactobacillus rhamnosus* и *Bifidobacterium lactis* оказывает незначительное влияние на отдельные параметры иммунитета у пациентов с полипэктомией и раком толстой кишки. *Br J Nutr* 97:676-684.

42. Уортли Д.Л., Леу РК, Уайтхолл В.Л., Конлон М., Кристоферсен С., Белобрадич Д., Маллитт К.А., Ху У, Ирахара Н., Огино С., Легgett Б.А., молодой врач общей практики. 2009. Двойное слепое плацебо-контролируемое перекрестное исследование пребиотических, пробиотических и синбиотических добавок на людях: влияние на просветные, воспалительные, эпигенетические и эпителиальные биомаркеры колоректального рака. *Am J Clin Nutr* 90:578-586.

43. Рафтер Дж., Беннетт М., Кадерни Г., Клюн У., Хьюз Р., Карлссон П.К., Клиндер А., О'Риордан М., О'Салливан Г.К., Пул-Зобель Б., Речкеммер Г., Роллер М., Роулэнд И., Сальвадори М., Тийс Х., Ван Лоо Дж., Ватцл Б., Коллинз Дж. К. 2007. Диетические синбиотики снижают факторы риска развития рака у пациентов с полипэктомией и раком толстой кишки. *Am J Clin Nutr* 85:488-496.

44. Лю Ж, Хуан М.Дж., Чжан Сю, Ван Л., Хуан Н.К., Пэн Х., Лан П., Пэн Дж.С., Ян З., Ся У, Лю В.Дж., Ян Дж., Цинь Л.Л., Ван Дж.П., 2013. Влияние периоперационного лечения пробиотиками на концентрацию зонулина в сыворотке крови и последующие послеоперационные инфекционные осложнения после операции по удалению колоректального рака: двухцентровое и двойное слепое рандомизированное клиническое исследование. *Am J Clin Nutr* 97:117-126.

45. Лю З, Ли С, Хуан М, Тонг С, Чжан Х, Ван Л, Пэн Х, Лан П, Чжан П, Хуан Н, Пэн Дж, Ву Х, Луо У, Цинь Х, Кан Л, Ван Дж. 2015. Положительное регулирующее воздействие периоперационного лечения пробиотиками на послеоперационные осложнения со стороны печени после операции с метастазами в прямой кишке в печени: двухцентровое и двойное слепое рандомизированное клиническое исследование. *ВМС Гастроэнтерол* 15:34

46. Lin H.C., Su B.H., Chen A.C., Lin T.W., Tsai C.H., Yeh T.F., Oh W. 2005. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 115:1-4.

47. Lin H.C., Hsu C.H., Chen H.L., Chung M.Y., Hsu J.F., Lien R.I., Tsao L.Y., Chen C.H., Su B.H. 2008. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 122:693-700.

48. Bin-Nun A., Bromiker R., Wilschanski M., Kaplan M., Rudensky B., Caplan M., Hammerman C. 2005. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 147:192–196.

49. Цуэрчер А.В., Фриче Р., Кортези Б., Наемье А. 2006. Пищевые продукты и развитие аллергии, профилактика и лечение. *Curr Opin Biotechnol* 17:198-203.

50. Паломарес О., Яман Г., Азкур А.К., Аккок Т., Акдис М., Акдис ОК. 2010. Роль Treg в иммунной регуляции аллергических заболеваний. *Eur J Иммунол* 40:1232-1240

51. Toh Z.Q., Anzela A., Tang M.L., Личчарди П.В. 2012. Пробиотическая терапия как новый подход к лечению аллергических заболеваний. *Передняя фармакол* 3:171.

52. Систек Д., Келли Р., Викенс К., Стэнли Т., Фицхаррис П., Крейн Дж. 2006. Ограничивается ли влияние пробиотиков на атопический дерматит детьми, чувствительными к пище? *Клинический опыт аллергии* 36: 629-633.

53. Герасимов С.В., Васюта В. В., Михович О.О., Бондарчук Л.И. 2010. Пробиотическая добавка уменьшает атопический дерматит у детей дошкольного возраста: рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование. *Am J Clin Dermatol* 11:351-361.

54. Yeşilova Y., Çalka Ö., Akdeniz N., Berktaş M. 2012. Влияние пробиотиков на лечение детей с атопическим дерматитом. *Энн Дерматол* 24:189-193.

55. Van Andeler L.B., Heymans H.S., Van Aalderen W.M., Sillevius Smitt J.H., Knol J., Ben Amor K., Goossens D.A., Sprickelman A.B., Synbad Study Group. 2010. Effect of a new synbiotic mixture on atopic dermatitis in infants: a randomized-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 40:795–804.

56. Singh A., Hacini-Rachinel F., Gosoniu M.L., Bourdeau T., Holvoet S., Doucet-Ladeveze R., Beaumont M., Mercenier A., Nutten S. 2013. Immunomodulatory effect of probiotic *Bifidobacterium lactis* NCC2818 in individuals suffering from seasonal allergic rhinitis to grass pollen: an exploratory, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Clin Nutr* 67:161–167.

57. Xiao J.Z., Kondo S., Yanagisawa N., Takahashi N., Odamaki T., Iwabuchi N., Iwatsuki K., Kokubo S., Togashi H., Enomoto K., Enomoto T. 2006. Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 [corrected] in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Investig Allergol Clin Immunol* 16:86–93.

58. Huurre A., Laitinen K., Rautava S., Korkeamari M., Isoulari E. 2008. Влияние материнской атопии и пробиотических добавок во время беременности на сенсibilизацию младенцев: двойное слепое плацебо-контролируемое исследование. *Клинический опыт аллергии* 38: 1342-1348.

59. Доттеруд К.К., Стоппо О., Йонсен Р., Ойен Т. 2010. Пробиотики у беременных женщин для профилактики аллергических заболеваний: рандомизированное двойное слепое исследование. *Br J Dermatol* 163:616-623.

60. Уикенс К., Блэк П.Н., Стэнли Т.В., Митчелл Э., Фицхаррис П., Таннок Г.В., Перди Г., Крейн Дж., Группа по изучению пробиотиков. 2008. Дифференциальный эффект 2 пробиотиков в профилактике экземы и атопии: двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование. *J Allergy Clin Immunol* 122:788-794.

61. Kukkonen K., Savilahti E., Naahtela T., Juntunen-Backman K., Korpela R., Poussa T., Tuure T., Kuitunen M. 2007. Пробиотики и пребиотические галактоолигосахариды в профилактике аллергических заболеваний:

рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование. *J Allergy Clin Immunol* 119:192-198.

62. Ким Джи, Квон Дж.Х., Ан Ш., Ли С.И., Хан И.С., Чой ЙО, Ли С.И., Ан К.М., Джи Г.Е. 2010. Влияние пробиотической смеси (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) на первичную профилактику экземы: двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование. *Иммунол от аллергии для педиатров* 21 (2р2): e386–e393.

63. Niers L., Martín R., Rijkers G., Sengers F., Timmerman H., Van Uden N., Smidt H., Kimpen J., Hoekstra M. 2009. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the Panda study). *Allergy* 64:1349–1358.

64. Soh S.E., Aw M., Gerez I., Chong Y.S., Rauff M., Ng Y.P., Wong H.B., Pai N., Lee B.W., Shek L.P. 2009. Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants--effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year. *Clin Exp Allergy* 39:571–578.

65. Fiocchi A., Pawankar R., Cuello-Garcia C., Ahn K., Al-Hammadi S., Agarwal A., Beyer K., Burks W., Canonica G.W., Ebisawa M., Gandhi S., Kamenwa R., Lee B.W., Li H., Prescott S., Riva J.J., Rosenwasser L., Sampson H., Spigler M., Terracciano L., Vereda-Ortiz A., Wasserman S., Yepes-Nuñez J.J., Brożek J.L., Schünemann H.J. 2015. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): probiotics. *World Allergy Organ J* 8:4.

66. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том 3: Пробиотики и функциональное питание. М.: ГРАНТЬ, 1999. С.40.

67. Бегунова А.В., Савинова О.С., Рожкова И.В., Крысанова Ю.И., Фёдорова Т.В.. Оценка пробиотического потенциала и функциональных свойств *Lactobacillus reuteri* Ir1 in vitro. Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 5. – С. 472–482.

68. Шишин, М.В., Просеков А.Ю. Исследование морфологических и антимикробных свойств микроорганизмов кишечного тракта. Техника и технология пищевых производств. – 2015. – Т. 39, № 4. – С. 131–137.

69. Волкова, Г.С., Куксова Е.В., Сербя Е.М.. Изучение биологических межштаммовых взаимодействий и ростовых свойств производственных штаммов молочнокислых бактерий. Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. 2020. – Т. 1, № 1 (1). – С. 104–109.

70. Goldenberg G.G. Surface – active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. 224-229с.

71. Rosenberg E. Biosurfactants. In: *The Prokaryotes. A hand book on the Biology of Bacteria.* New York, Springer, Science, Business Media Inc., 2006.

72. Малов В. А., Гюлазян Н. М. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: современное состояние проблемы, 2007. -№6. -С.24-28.

73. Харитоновна Л.А. «Педиатрия. Приложение *Consilium Medicum*», 2007, № нарушений микробиоценоза кишечника у детей раннего возраста 2, с. 36-41 Формирование микроэкологии кишечника и способы коррекции

74. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания. М.: Наука. 2005.

75. Коршунов В.М. Проблема регуляции микрофлоры кишечника // *Ж. микробиол.* 1995. №3 с. 48-53 .

76. Поспелова В.В., Шабанская М.А., Морозова Л.В. Биологическая характеристика некоторых производственных и свежесывороточных штаммов лактобацилл.- В кн. *Медицинские аспекты микробной экологии* (ред.Шендеров Б.А.).М., 1992. Вып.6. С.54-57.

77. Лихачева А.Ю., Бондаренко В.М. Современное состояние вопроса о номенклатуре и таксономии бактерий рода *Lactobacillus* // Тез.конф. «Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека». М., 21-23 апреля 1999. с.30-31.

78. Лянная А.М., Интизаров М.М., Донских Е.Е. Биологические и экологические особенности рода *Bifidobacterium*.- В кн.: Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве (ред. Никитин). М.,1986. С.32-38

79. Бондаренко, В. М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром : современное состояние проблемы / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 389 с.

80. Воробьев А.А., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. и др. Микрoэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосо-держащими пробиотиками // Вестн. РАМП.- 2004. -№2.- С. 13-17.

81. Гончарова Г.И. Бифидофлора человека и необходимость ее оптимизации.- В кн. Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве. (ред. Никитин). М., 1986. с 10-17

82. Соколова К.Я., Соловьева И.В. «Дисбактериозы», Н-Новгород, 1999

83. Шендеров Б.А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека. Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 1998; 8 (1): 61–65.

84. Clavel T., Haller D,. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. Curr issues intestinal Microbiol. ,2007,8; P.25-43.

85. Осадчук М.А., Чиж А.Г., Желнова Т.И., Осадчук А.М. Дисбактериоз в практике клинициста. Издательство Саратовского медицинского университета, 2002, - 307 с.

86. Горская Е.М. Адгезия микробов к эпителиальным клеткам кишечника // Антибиотики и микробиология человека. - Москва, 1987. - С.79-82.

87. Бочков И.А. Особенности формирования аутомикрофлоры у новорожденных детей в раннем неонатальном периоде. Дисс. докт. мед. наук. М., 1998.

88. Бойцов А.Г., Рищук С.В., Ильясов Ю.Ю., Гречанинова Т.А. Адгезия лактобактерий к клеткам вагинального и буккального эпителия. Вестн. Санкт-Петербургской мед. академии им. И.И. Мечникова. 2004; 4 (5): 191–193.

89. Рахимова Н.Г., Ханина Г.И. и др. Биопрепараты, нормализующие микрофлору кишечника: итоги двадцатилетних исследований по проблеме.- В кн.: Антибиотики и колонизационная резистентность.(ред. Шендеров).М., 1990.

90. Vig R, Gordon JR, Thebaud B, Befus AD, Vliagoftis H: The Effect of Early-Life Stress on Airway Inflammation in Adult Mice. *Neuroimmunomodulation* 2010;17:229-239

91. Humbert Florence Les probiotiques: un sujet d' actualite //Bull. inf. Stat. exp. auicult. Ploufragan. - 1988. - V. 28, N 3. - P. 128-130.

92. Амерханова А.М., Дифференцированный подход к возрастным группам больных – залог эффективности применения пробиотических средств, 2002.

93. Грачева, Н.М. Сравнительная оценка клинико-лабораторной эффективности современных про- и пребиотических препаратов в коррекции дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта : отчет о клинико-лабораторном исследовании / Н.М. Грачева [и др.]. – М.: Московский НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 2010. – 23 с.

94. Донец В. Н. Возможности пробиотической терапии внебольничных пневмоний (клинико-экспериментальное исследование). Автореф. Канд. дис. Санкт-Петербург. 2015 .

95. Чичерин, И.Ю. Пробиотики: вектор развития / И.Ю. Чичерин [и др.] // Практическая медицина. – 2012. – № 3. – С. 180–188.

96. Данилевская, Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков // Ветеринария 2005 – №11. – С. 6-10.

97. Senok A. C. et al. Probiotics: facts and myths. //Clin. Micr. And Inf. 2005; 11, 12: 958-966.

98. Шендеров Б.А. Функциональное питание, криогенные банки микробиоценозов и их роль в сохранении и восстановлении здоровья. Вестн. восст. медицины. 2003; 1: 29–31.

99. Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Isolauri E. Salminen S.J. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus FEMS Microbiol. Lett. 1998; 167 (2): 185–189.

100. Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю. Создание аутопробиотического препарата, содержащего активный комплекс бифидобактерий и лактобактерий Выпуск Ноябрь. МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ. 2015.

101. Суворов А. Н. Способ получения пробиотического продукта, содержащего аутоштаммы лактобактерий. Патент № 2010154822, 2012.

102. Черных Л. Е. Способ получения биомассы аутоштамма лактобактерий жидкой "лакти" Патент RU № 2320355, 2002.

103. Денисова Н.Г. Применение штаммов собственных лактобактерий для восстановления нарушенного биоценоза влагалища. Автореф. Канд.дис., , Самара, 2008 г.

104. Farias CBV, Almeida FCG, Silva I. A., et al. Production of green surfactants: market prospects. Electron J Biotechnol. 2021;51:28–39.

105. Carolin C.F., Kumar P.S., Ngueagni P.T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: types, production, properties and its application in the bioremediation process. *J. Hazard Mater.* 2021;407.
106. Beck A., Zibek S.. Growth behavior of selected ustilaginaceae fungi used for mannosylerythritol lipid (MEL) biosurfactant production - evaluation of a defined culture medium. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 1–17.
107. Kumar A., Singh S.K., Kant C., et al. Microbial biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants.* 2021;10(9):1472.
108. Rodríguez A., Gea T., Font X. Sophorolipids production from oil cake by solid-state fermentation. Inventory for economic and environmental assessment. *Front Chem Eng.* 2021;3:632752.
109. Seo D.H., Yoo S.H., Choi S.J., Kim Y.R., Park C.S.. Разностороннее биотехнологическое применение амилосахаразы, новой глюкозилтрансферазы. *Пищевая наука. Биотехнолог.* 29: 1–16.2020.
110. Kim SY, Seo DH, Kim SH, Hong YS, Lee JH, Kim YJ, Jung DH, Yoo SH, Park CS. Сравнительное исследование четырех амилосахараз из видов *Bifidobacterium*. *Международ. Дж. Биол. макромол.* 155: 535-542. 2020.
111. Косарич Н., Сукан Ф.В.. БиопАВ: производство: свойства: применение. CRC Press, БокаРатон, Флорида, США. стр. 67. 2010.
112. Rehm V.H. Бактериальные полимеры: биосинтез, модификации и применения. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:578-592. 2010.
113. Идальго-Кантабрана С, Санчес Б, Милани С, Вентура М, Марголес А, Руас-Мадьедо П. Геномный обзор и биологические функции биосинтеза экзополисахаридов у *Bifidobacterium* spp. *Environ Microbiol.* 2014 Январь; 80(1):9-18. doi: 10.1128.
114. Ковалевская В.С., Молодкина Н.Р., Тимофеев Т.И. Научные труды КубГТУ. №14. 2016. С.284-288.

115. О'Хара А.М., Шанахан, Ф. Кишечная флора как забытый орган. Отчеты ЕМВО, 7, 688-693. 2006.
116. Пиксасова О.В. Новый подход к молекулярной диагностики бифидобактерий: автореферат дис. кандидата биологических наук: 03.00.07. МГУ, Москва.2009. 23С.
117. Динан Т.Г., Крайан Дж.Ф. Ось Мозг-кишечник-микробиота и психическое здоровье. *Psychosom Med*, 79. 2017. С.920-926.
118. Томас В.Е., Тринчина Е., Фореро М., Фогель В., Сокуренок Е.В. Бактериальная адгезия к клеткам-мишеням усиливается за счет силы сдвига. *Cell*. 2002; 109:913-923.
119. Ясур М., Ватанен Т., Сильяндер Х., Хамалайнен А.М., Харконен Т., Риханен С.Ю., Францоа Е. А., Вламакис Х., Хаттенхауэр С., Геверс Д., Ландер Е. С., Книп М. Естественная история микробиома кишечника младенца и влияние лечения антибиотиками на разнообразие и стабильность бактериальных штаммов. *Научный перевод Med8*: 343ra81. 2016.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Минлигареева Елена Вячеславовна
 Проверяющий: Халитова Рита Камилевна
 Организация: Башкирский государственный медицинский университет
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 2359
 Начало загрузки: 10.06.2023 07:39:00
 Длительность загрузки: 00:00:14
 Имя исходного файла: Диплом. колосова.docx
 Название документа: Диплом. колосова
 Размер текста: 144 кБ
 Тип документа: Дипломный проект
 Символов в тексте: 147526
 Слов в тексте: 16577
 Число предложений: 2178

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 10.06.2023 07:39:15
 Длительность проверки: 00:02:15
 Корректировка от 10.06.2023 08:09:43
 Комментарий: [Автосохраненная версия]
 Поиск с учетом редактирования: да
 Проверенные разделы: основная часть с. 1,5-92, библиография с. 93-108
 Модули поиска: ИПС Адилет, Модуль поиска "БГМУ", Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирование по eLIBRARY.RU, Перефразирование по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирование по Интернету, Перефразирование по Интернету (EN), Перефразирование по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



Совпадения	Самоцитирования	Цитирования	Оригинальность
24,29%	0%	5,18%	70,53%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирование — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирование — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы, библиография, фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарии
[01]	18,12%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	
[02]	6,78%	1,94%	https://esu.cisus.ru/krbts/YBEN2Q2RBJ18VPWDDNj6MCZ	раньше 2011	Интернет Плюс*	
[03]	5,12%	4,02%	http://bibliogost.ru	03 Мая 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[04]	4,66%	0,74%	http://elibrary.ru	03 Мая 2017	eLIBRARY.RU	
[05]	4,46%	0,07%	https://spravochnic.ru	08 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[06]	4,26%	0%	https://cyberleninka.ru	02 Апр 2021	Интернет Плюс*	
[07]	4,26%	0%	https://cyberleninka.ru	21 Ноя 2022	Интернет Плюс*	
[08]	4,04%	0,09%	http://bibliogost.ru	27 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	
[09]	4,04%	0%	http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	
[10]	4,04%	0%	https://bcoo.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	
[11]	3,91%	0,06%	http://bestpravo.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	

[12]	3,91%	0%	Бактериологическая диагностика дисбактериоза ки... http://bestpravo.ru	28 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[13]	3,85%	3,85%	Методические рекомендации "Бактериологическая... http://ivo.garant.ru	01 Фев 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация
[14]	3,81%	0%	Методические рекомендации. Бактериологическая ... https://files.yroyinf.ru	19 Мая 2021	Интернет Плюс*
[15]	3,79%	0%	Методические рекомендации. Бактериологическая ... https://meganoorm.ru	14 Дек 2022	Интернет Плюс*
[16]	3,79%	0%	20_62_8_0_0_600_77641138 Бактериологическая диаг... http://bestpravo.ru	10 Июн 2023	Интернет Плюс*
[17]	3,79%	0%	Бактериологическая диагностика дисбактериоза ки... http://lawru.info	08 Июн 2023	Интернет Плюс*
[18]	3,79%	0%	Бактериологическая диагностика дисбактериоза ки... http://bestpravo.ru	19 Мая 2021	Интернет Плюс*
[19]	3,78%	0%	"Бактериологическая диагностика дисбактериоза к... http://libussr.ru	19 Мая 2021	Интернет Плюс*
[20]	3,5%	0%	Болезни кишечника http://studentlibrary.ru	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС
[21]	3,2%	0,54%	Харченко, Наталья Васильевна Выделение бифидоб... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ
[22]	2,99%	0,04%	ВЫДЕЛЕНИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ П... http://bio.msu.ru	28 Фев 2022	Интернет Плюс*
[23]	2,93%	2,64%	Методические рекомендации - Дисбактериоз кише... http://medi.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[24]	2,88%	0%	http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/768/DISSERTA... http://bio.msu.ru	05 Окт 2020	Интернет Плюс*
[25]	2,88%	0%	http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/768/DISSERTA... http://bio.msu.ru	05 Окт 2020	Интернет Плюс*
[26]	2,85%	0%	http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/768/DISSERTA... http://bio.msu.ru	05 Окт 2020	Интернет Плюс*
[27]	2,31%	0,6%	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОБИОТИКОВ В ПРАКТИКЕ ВРА... http://elibrary.ru	05 Авг 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[28]	2,16%	0,03%	https://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/768/DISSERT... https://bio.msu.ru	17 Янв 2022	Интернет Плюс*
[29]	2,16%	0%	https://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/768/DISSERT... https://bio.msu.ru	14 Апр 2022	Интернет Плюс*
[30]	2,04%	1,74%	Полный текст диссертации http://sina.msu.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[31]	2,03%	0%	Дисбактериоз кишечника. Часть 1. https://medi.ru	10 Июн 2023	Интернет Плюс*
[32]	2%	0%	Методические рекомендации - Дисбактериоз кише... http://adventus.info	08 Июн 2023	Интернет Плюс*
[33]	1,95%	0%	Дисбактериоз кишечника. Часть 1. https://medi.ru	08 Июн 2023	Интернет Плюс*
[34]	1,95%	0%	Дисбактериоз кишечника. Часть 1. https://medi.ru	08 Июн 2023	Интернет Плюс*
[35]	1,73%	0,13%	Дисбактериоз кишечника - Дисбактериоз кишечни... http://medi.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету
[36]	1,56%	0%	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОБИОТИКОВ В ПРАКТИКЕ ВРА... http://elibrary.ru	05 Авг 2016	eLIBRARY.RU
[37]	1,55%	0,16%	СПОСОБ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ПРОБИОТ... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	eLIBRARY.RU
[38]	1,53%	0,32%	СПОСОБ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ПРОБИОТ... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[39]	1,5%	0,08%	способ индивидуального подбора пробиотических ... http://freepatent.ru	26 Янв 2022	Интернет Плюс*
[40]	1,35%	0%	СПОСОБ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ПРОБИОТ... https://patenton.ru	02 Авг 2021	Интернет Плюс*
[41]	1,28%	1,21%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	28 Мая 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация
[42]	1,26%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	28 Мая 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация
[43]	1,28%	0%	№ 4 (5) http://emil.ru	28 Апр 2017	Медицина
[44]	1,24%	0%	Способ индивидуального подбора пробиотических... http://findpatent.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ
[45]	1,24%	0,04%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	26 Апр 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация
[46]	1,2%	0%	Микробиология кисломолочных продуктов - рефер... http://conref.ru	19 Июн 2021	Интернет Плюс*
[47]	1,19%	0,94%	Рищук, Сергей Владимирович диссертация ... докто... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ
[48]	1,19%	0,3%	Актуальные вопросы диагностики и лечения дисба... http://elibrary.ru	05 Авг 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU
[49]	1,08%	0,08%	Аутопробиотики как средство профилактики инфек... http://elibrary.ru	16 Дек 2016	eLIBRARY.RU
[50]	1,07%	0,03%	Дисбактериоз кишечника. Часть 2. https://medi.ru	22 Июн 2022	Интернет Плюс*
[51]	1,04%	0%	Леванова, Людмила Александровна диссертация ... А... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ
[52]	1,04%	0,83%	prof http://kpfu.ru	17 Сен 2017	Интернет Плюс*

[53]	1,04%	0%	https://kpfu.ru/portal/docs/F1250326711/posobie... https://kpfu.ru	29 Янв 2019	Интернет Плюс*	
[54]	1,04%	0,36%	Микробиоценоз кишечника и его роль в развитии ... http://mil-ua.com	27 Окт 2020	Интернет Плюс*	
[55]	1,02%	1,02%	Статья о: холестерина, фузобактерии, бта, колопрок... http://fmy.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[56]	1,01%	0,18%	Барузатова, Татьяна Викторовна диссертация ... докт... http://dlib.rsl.ru	20 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ	
[57]	1,01%	0,1%	2.2. Пробирочный метод учета колоний в полужидк... http://studfiles.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[58]	0,99%	0%	http://www.rishchuk.ru/pdf/bojtsovrischuk-i-dr-adjegi... http://rshchuk.ru	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[59]	0,98%	0%	Зайнуллина, Олеся Николаевна Современные возм... http://dlib.rsl.ru	09 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	
[60]	0,97%	0%	CANDIDA SPP. И МИКРОБОЦЕНОЗ ПОЛОСТИ РТА У Д... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	
[61]	0,96%	0,96%	АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ... http://elibrary.ru	13 Янв 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[62]	0,93%	0%	Микробиологический анализ качества кисломолоч... https://works.doblad.ru	08 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[63]	0,88%	0,26%	БИФИДОБАКТЕРИИ: ПРОБЛЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ... http://elibrary.ru	31 Авг 2017	eLIBRARY.RU	
[64]	0,88%	0,08%	Информация Министерства здравоохранения РФ от... http://wv.garant.ru	13 Окт 2013	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	
[65]	0,87%	0,87%	СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ С... http://elibrary.ru	31 Янв 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[66]	0,86%	0%	Тармакова, Светлана Степановна диссертация ... док... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[67]	0,85%	0,04%	https://organosyn.com.ua/downloads/0000/0623/artid... https://organosyn.com.ua	08 Июн 2021	Интернет Плюс*	
[68]	0,85%	0,08%	Пробиотические свойства бифидобактерий. https://elibrary.ru	15 Июл 2022	eLIBRARY.RU	
[69]	0,82%	0,01%	https://organosyn.com.ua/downloads/0000/0623/artid... https://organosyn.com.ua	08 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[70]	0,81%	0,12%	2022 ТППЫТ ЛП Машенко Э.Е. Биотехнология преп... http://elibrary.ru	30 Ноя 2022	Кольцо вузов	
[71]	0,8%	0,1%	СИНДРОМ ИЗБЫТОЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО РОСТ... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	eLIBRARY.RU	
[72]	0,79%	0,22%	КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИ... https://docplayer.ru	18 Июн 2021	Интернет Плюс*	
[73]	0,79%	0%	https://kpfu.ru/portal/docs/F1250326711/posobie... https://kpfu.ru	13 Апр 2022	Интернет Плюс*	
[74]	0,78%	0,19%	Степаненко, Петр Петрович Учебник для студентов ... http://dlib.rsl.ru	26 Дек 2011	Сводная коллекция РГБ	
[75]	0,77%	0,02%	http://propionix.ru/d/672350/d/iv_andreyeva_potentsi... http://propionix.ru	23 Июн 2022	Интернет Плюс*	
[76]	0,76%	0,14%	Кабисов, Руслан Гельбертович диссертация ... докто... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[77]	0,74%	0%	СОВРЕМЕННЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ РО... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	
[78]	0,73%	0,73%	Современные концепции применения пробиотико... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	
[79]	0,72%	0,35%	Иванова, Татьяна Николаевна диссертация ... канди... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[80]	0,71%	0%	Commensal Obligate Anaerobic Bacteria and Health: Pr... https://frontiersin.org	07 Апр 2021	СМИ России и СНГ	
[81]	0,7%	0%	Дисбактериоз кишечника. Часть 2. https://medi.ru	12 Апр 2021	Интернет Плюс*	
[82]	0,7%	0%	Дисбактериоз кишечника. Часть 2. https://medi.ru	22 Июн 2022	Интернет Плюс*	
[83]	0,69%	0%	Диссертация на тему «Антагонистическая и адгезив... https://dissercat.com	08 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,68%	0,48%	БИФИДОБАКТЕРИИ: ПРОБЛЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ... http://elibrary.ru	31 Авг 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[85]	0,64%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... https://base.garant.ru	18 Авг 2021	Интернет Плюс*	
[86]	0,64%	0%	Ким, Сергей Анатольевич диссертация ... кандидата ... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[87]	0,62%	0%	Кирилленко, Марина Александровна Оценка свойств ... http://dlib.rsl.ru	09 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,62%	0,46%	ЛИМФОЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АУТОШТАМ... https://elibrary.ru	16 Янв 2013	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[89]	0,6%	0%	Микробиоценоз кишечника и его роль в развитии ... http://mil-ua.com	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[90]	0,6%	0,34%	Аутопробиотики как средство профилактики инфек... http://elibrary.ru	16 Дек 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[91]	0,59%	0%	T, S, N 4 http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,58%	0%	The Role of Prebiotics and Probiotics in Prevention of A... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	
[93]	0,57%	0%	Способ индивидуального подбора пробиотических... http://imopate.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[94]	0,57%	0,57%	Нутрициология в гастроэнтерологии http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	

[95]	0,56%	0%	259015 http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,56%	0%	Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gu... https://doi.org	31 Мая 2011	Издательство Wiley	
[97]	0,55%	0%	Соловьева, Ирина Владленовна диссертация ... докт... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,54%	0%	Probiotics in Medicine: A Long Debate https://ironpress.in.org	25 Сен 2020	СМИ России и СНГ	
[99]	0,54%	0%	Фармакоэпидемиологические, экономические и ме... http://emil.ru	20 Янв 2020	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,51%	0%	Методические рекомендации "Применение бактер... http://ivo.garant.ru	27 Янв 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	
[101]	0,5%	0%	Lactobacillus GG treatment during pregnancy for the p... https://doi.org	30 Апр 2011	Издательство Wiley	
[102]	0,5%	0%	Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease https://frontiersin.org	30 Янв 2022	СМИ России и СНГ	
[103]	0,49%	0%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,48%	0%	Разработка новых методов лечения у больных хро... http://diss.nadlib.uz	29 Авг 2014	Коллекция НБУ	
[105]	0,48%	0,48%	Рациональная антимикробная терапия http://stud.dndlib.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[106]	0,48%	0,48%	Пробиотики термин пробиотики можно рассматри... http://mognovsa.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[107]	0,47%	0%	International Consensus Statement on Allergy and Rhi... https://doi.org	28 Фев 2018	Издательство Wiley	
[108]	0,47%	0%	Дисбиотические нарушения микрофлоры кишечника... http://diss.nadlib.uz	31 Мая 2017	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,46%	0%	Probiotic effects in allergic disease https://doi.org	30 Сен 2013	Издательство Wiley	
[110]	0,44%	0%	Т. 93, № 5, сентябрь-октябрь http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	
[111]	0,44%	0%	Т. 7, № 11 http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,43%	0%	Маннапов, Альфир Габдулович диссертация ... докт... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,43%	0%	Николаева, Оксана Николаевна диссертация ... канд... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,41%	0%	Артюкова, Светлана Ивановна диссертация ... докто... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,39%	0%	Технология пробиотических моно- и поливидовых ... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,37%	0,27%	Дисбактериоз кишечника - Дисбактериоз кишечника... http://medi.ru	22 Янв 2022	Перефразирования по Интернету	
[117]	0,37%	0%	A systematic review and meta-analysis of probiotics fo... https://doi.org	30 Июн 2015	Издательство Wiley	
[118]	0,35%	0%	Немченко, Ульяна Михайловна Микроэкологическ... http://dlib.rsl.ru	14 Сен 2020	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0,34%	0%	Probiotic Use in Neonates https://doi.org	28 Фев 2009	Издательство Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,34%	0%	Вопросы детской диетологии. 2017. Т. 15, № 5 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,33%	0%	72856 http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0,33%	0%	Состояние колонизационной резистентности толст... http://emil.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[123]	0,33%	0%	Eosinophils, probiotics, and the microbiome https://doi.org	30 Ноя 2016	Издательство Wiley	
[124]	0,31%	0%	Фадеева, Нина Александровна Роль микрофлоры то... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	
[125]	0,28%	0%	Влияние адеметионина на коллоидно-солюбилизац... http://diss.nadlib.uz	25 Мая 2017	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0,28%	0%	Зверева, Ольга Алексеевна диссертация ... кандидат... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[127]	0,28%	0%	Смузи нового поколения с пробиотиками	31 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	0,27%	0%	Diplom_Shapovalov_fmb_360401_2023	11 Мая 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0,27%	0%	Роль кишечной микрофлоры в жизнедеятельности ... http://medlinks.ru	10 Янв 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	0,27%	0%	Способ индивидуального подбора препаратов, сод... http://findpatent.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	0,26%	0%	Bifidobacterium carbohydrases - their role in breakdow... https://doi.org	31 Янв 2008	Издательство Wiley	
[132]	0,26%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[133]	0,26%	0%	Питательная композиция, содержащая штаммы bif... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[134]	0,26%	0%	Статья в журнале Вестник Российской академии ме... http://samsnu.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[135]	0,25%	0%	Копрологические исследования толстого кишечника... http://books.ru	09 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[136]	0,25%	0%	115069 http://biblioclub.ru	14 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	0,24%	0%	Эффективность использования пробиотиков "Бифи... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	0,23%	0%	Выделение, селекция и характеристика биотехноло... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[139]	0,23%	0%	Микрофлора молока и молочных продуктов Карак... http://diz.nadib.uz	02 Апр 2017	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[140]	0,22%	0%	Интенсивность роста и естественная резистентност... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[141]	0,22%	0%	Стафилококки в организме человека и во внешней ... http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	
[142]	0,21%	0%	Голубцова, Юлия Марковна диссертация ... кандида... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[143]	0,21%	0%	Приказ Минздрава РФ от 9 июня 2003 г. N 231 "Об ут... http://ivo.garant.ru	11 Окт 2003	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[144]	0,2%	0%	Способ моделирования дисбактериоза кишечника ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[145]	0,2%	0%	МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КИШЕЧНИ...	23 Дек 2018	СМИ России и СНГ	
[146]	0,2%	0%	Control of fire blight (<i>Erwinia amylovora</i>) on apple tree... https://frontiersin.org	19 Ноя 2020	СМИ России и СНГ	
[147]	0,2%	0%	Разработка принципов диетотерапии с включение... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	
[148]	0,19%	0%	Methods of treating a respiratory condition comprising... http://freepatersonline.com	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[149]	0,19%	0%	Т. 331, № 6 http://emil.ru	26 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[150]	0,19%	0%	Арчакова, Елена Геннадьевна Совершенствование ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2004	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[151]	0,19%	0%	Dietary, nondigestible oligosaccharides and Bifidobacte... https://doi.org	31 Июл 2017	Издательство Wiley	
[152]	0,17%	0%	ПОБОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРА... http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[153]	0,17%	0,08%	Консорциум бифидобактерий bifidobacterium bifidu... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[154]	0,17%	0%	Штамм bifidobacterium breve ov-12, используемый д... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[155]	0,16%	0%	Диагностика и профилактика нозокомальных инф... http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[156]	0,15%	0%	BRANCHED CHAIN FATTY ACIDS FOR PREVENTION OR ... http://freepatersonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[157]	0,15%	0%	Модуляция функционального состояния сердца к... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[158]	0,15%	0%	Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gu... https://doi.org	31 Май 2011	Перезафразирования по коллекции издательства Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[159]	0,15%	0%	Acetate and Lactate Production During Two-Stage Ana... https://frontiersin.org	06 Окт 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[160]	0,15%	0%	A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifid... https://doi.org	13 Апр 2021	Перезафразирования по коллекции издательства Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[161]	0,14%	0%	011028650429_каз_В050_Байзакова_Эйгерим_Марал...	25 Мая 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[162]	0,14%	0%	Криомассаж и жидкие синбиотики в комплексном л... http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[163]	0,14%	0%	Overcoming the technological hurdles in the developm... https://doi.org	30 Июн 2005	Издательство Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[164]	0,14%	0%	Что такое пробиотики и каковы их функции. Зачем ... https://mnoegorod.bezformata.com/	31 Янв 2023	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[165]	0,14%	0%	з4731901/00330_Кривушина_МН	23 Мая 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[166]	0,13%	0%	Эстетическое восстановление депульпированных з... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[167]	0,13%	0%	Статья Идиатуллина Г.К. АНТИМИКРОБНАЯ ТЕРАПИЯ	19 Апр 2019	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[168]	0,13%	0%	Статья Идиатуллина Г.А.	02 Дек 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[169]	0,13%	0%	Прошло заседания межведомственной комиссии п... https://ufa.bezformata.com	21 Дек 2022	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[170]	0,13%	0%	Коронавирус COVID-19 http://ivo.garant.ru	08 фев 2020	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[171]	0,13%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	05 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[172]	0,13%	0%	236694 http://biblioclub.ru	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[173]	0,13%	0%	Infection of <i>Helicobacter pylori</i> and Atrophic Gastritis I... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[174]	0,13%	0%	http://orca.cf.ac.uk/53985/1/2013BullMJPhD.pdf	05 Янв 2018	Переводные заимствования (RuEn)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[175]	0,13%	0%	T. 31, № 4, июль-август http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[176]	0,13%	0%	Fecal Microbial Transplantation and Its Potential Appli... https://frontiersin.org	23 Сен 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[177]	0,13%	0%	Пути оптимизации мониторинга, профилактики и ф... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[178]	0,12%	0%	Gut Microbiome and Kidney Disease in Pediatrics: Does... https://frontiersin.org	05 Мар 2022	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[179]	0,12%	0%	Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization Afte... https://frontiersin.org	10 Мар 2021	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[180]	0,12%	0%	Изучение биологических свойств бифидо- и лактоб... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[181]	0,11%	0%	Effectiveness of fecal microbiota transplant for the trea... https://doi.org	01 Авг 2021	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[182]	0,11%	0%	Probiotics as alternative medicines against infectious di... http://freepatentsonline.com	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[183]	0,11%	0%	Extrusion of Dissolved Oxygen by Exopolysaccharide F... https://frontiersin.org	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[184]	0,11%	0%	Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, испол... http://findpatent.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[185]	0,11%	0%	Фитохимический анализ 2018	13 Апр 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[186]	0,11%	0%	Фитохимический анализ 2018 исправленный	01 Июнь 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[187]	0,11%	0%	Фитохимический анализ 2018	01 Июнь 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[188]	0,1%	0%	Lactisaeibacillus rhamnosus Reduces the Pathogenicit... https://frontiersin.org	01 Июнь 2021	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[189]	0,1%	0%	Assessment of murine lung mechanics outcome measu... https://frontiersin.org	14 Июл 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[190]	0,1%	0%	ОБ19 Дурдыев Б-микробиология	05 Дек 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[191]	0,1%	0%	Файзуллина Рената Ринатовна Диссер вариант ИВ ...	09 Окт 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[192]	0,1%	0%	Файзуллина Рената Ринатовна Диссер вариант от 11 ...	11 Окт 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[193]	0,1%	0%	испр.Петренко, А. Ю. Христюков, А. В. Яковлева, Д...	22 Мар 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[194]	0,09%	0%	Гидрогели на основе модифицированного декстран... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[195]	0,09%	0%	Комплексный обогатитель пищевого продукта. Пат... http://findpatent.ru	24 Июнь 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[196]	0,09%	0%	Композиция для коррекции дисбактериоза кишечн... http://bankpatentov.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[197]	0,09%	0%	Штамм бифидобактерий bifidobacterium adoescens... http://findpatent.ru	25 Июнь 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[198]	0,09%	0%	Vol. 49, № 7 http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[199]	0,09%	0%	Стимуляция биологической активности гриба рода ... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[200]	0,08%	0%	Особенности микробиоценоза и локального имму... http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[201]	0,08%	0%	Ribonucleotide Reductases from Bifidobacteria Contai... https://frontiersin.org	09 Фев 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[202]	0,08%	0%	ЛАКТУЛОЗА, ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ И ПЕРС...	14 Янв 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[203]	0,07%	0%	Морфофизиологические и иммунобиологические ... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[204]	0,07%	0%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[205]	0,05%	0%	Особенности клиники и лечения острых кишечных ... http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

