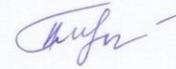


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

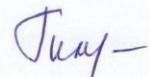
На правах рукописи



Потапова Светлана Михайловна

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФОРМИРОВАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ
АУТОШТАММОВ *LACTOBACILLUS* 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	61

<i>Lactobacillus</i> spp.	
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	76
<i>Lactobacillus</i> spp.	
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

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

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).

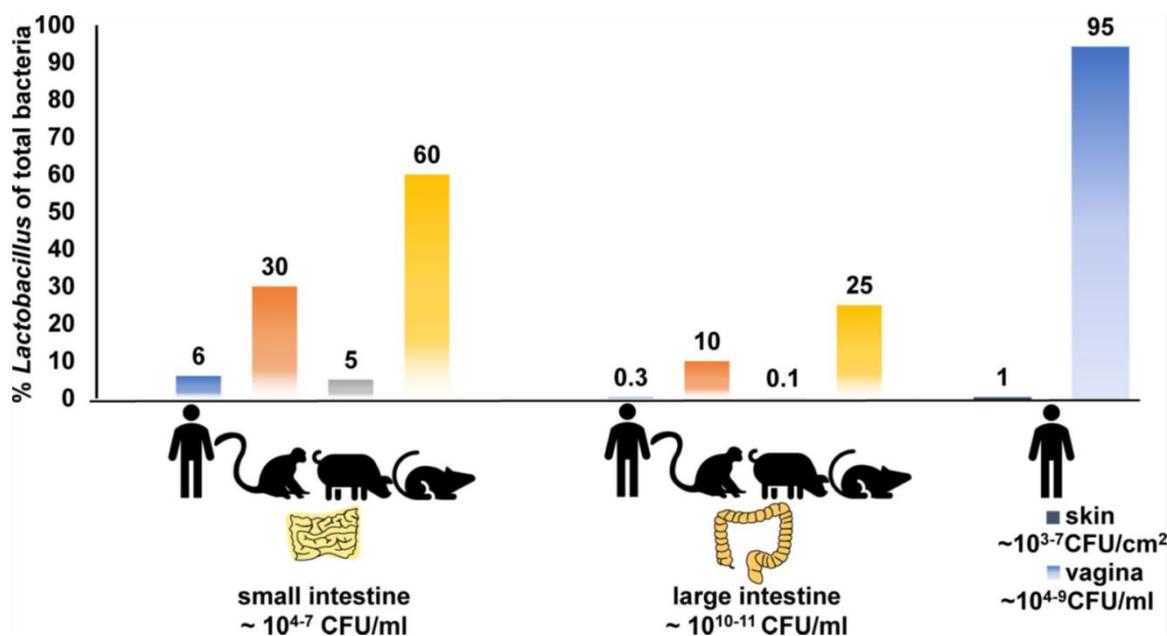


Рисунок 1. Относительная численность *Lactobacillus* spp. у людей и животных (указывано общее количество клеток бактериального сообщества организма) (Heeney et al., 2018)

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 МТХ и Caco-2/HT29МТХ. 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 оборудовании 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 биоплёнки проявлять патогенные свойства. Следует отметить, что биоплёнкообразование 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 (Laparra, 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; Mun˜ozetal., 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 противоифекционной 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’Ettorre 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’Ettorre 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 фарнезоидного x-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 ФАО 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 auratus gibelio* (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 персонифицированная 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 колоректальном 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 (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). 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 посеы 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 посеы инкубировали при 37 °С 24–48 ч; чашки со средой Сабуро оставляют после этого еще на двое суток при комнатной температуре 18–24 °С. Для культивирования анаэробов использовали анаэростаты, 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 засекали на соответствующие питательные среды для выделения лактобактерий (MRS 1). Через двое суток материал из изолированных колоний лактобактерий, выросших на среде MRS-1, вновь пересекали на соответствующие селективные питательные среды.

Выросшие через 2 суток после второго пассажа изолированные колонии лактобактерий пересекали 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 высеv 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 высеv 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 рассеивали 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 $\text{КОЕ} = 4,3 \times 10^9$: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 (временнóя пролетная 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 АЕ3000.

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 RhaII, 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 бальную 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 \geq 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 \pm 4) ч при температуре (37 \pm 1) $^{\circ}$ С. 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 гидроксид натрия. Активность кислотообразования определяли в градусах Тернера (Т $^{\circ}$) 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 ($^{\circ}$ Т) и менее - активность низкая;

100,0-149,9 ($^{\circ}$ Т) - средняя;

150,0 ($^{\circ}$ 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 испытуемыми 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 споросодержащие пробиотики.

2.2.9.2. Метод блоков для определения антагонистической активности аутолактобактерий

При использовании метода блоков испытуемую 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 испытуемой 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. Оценка 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 Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader («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.

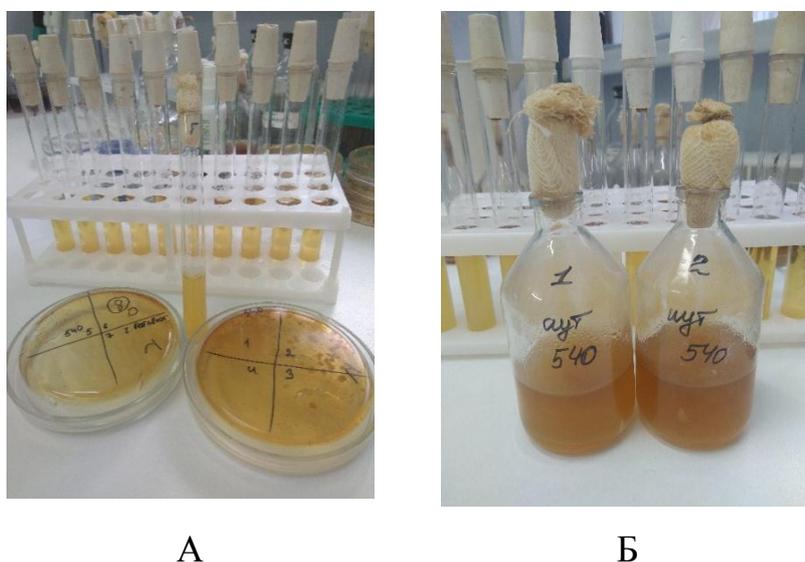
Данные в таблицах и на диаграммах представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно.

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 рассеивали на агаризованной среде до получения однородной популяции колоний лактобактерий, подтвержденных микроскопическим анализом морфологии клеток (рисунок 2).



А

Б

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 высева от -3 разведения до -5 - 6 - 7, до

получения отдельных колоний бактерий, каждая из которых может принадлежать к определенному виду (рисунок 3).

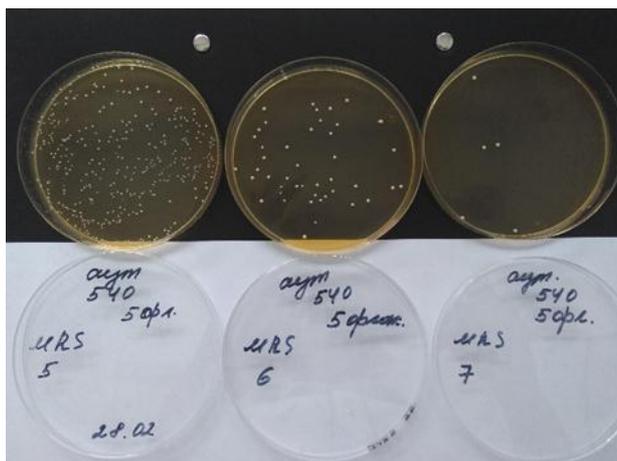


Рисунок 3 – Аутолактобактерии на твердой питательной среде MRS

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	образуют слабо выпуклые, полупрозрачные, серовато-белого цвета колонии с	образуют изолированные колонии в виде тяжей

	образовывать цепочки, беспорядочные скопления	сухой поверхностью	
<i>L. fermentum</i> Ku-f	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. delbrueckii</i> 14 UI-d	прямые палочки, удлиненные, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	образуют непрозрачные сероватые колонии	образуют изолированные колонии в виде тяжей
<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 тяжей
<i>L. fermentum</i> 10 POD	прямые палочки, полиморфные, расположенные одиночно, парами, могут	образуют слабо выпуклые, полупрозрачные, серовато-белого цвета колонии с	образуют изолированные колонии в виде тяжей

	образовывать цепочки, беспорядочные скопления	сухой поверхностью	
<i>L. plantarum</i> 7LV	прямые палочки, расположенные одиночно, парами, могут образовывать цепочки	образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии	образуют 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.

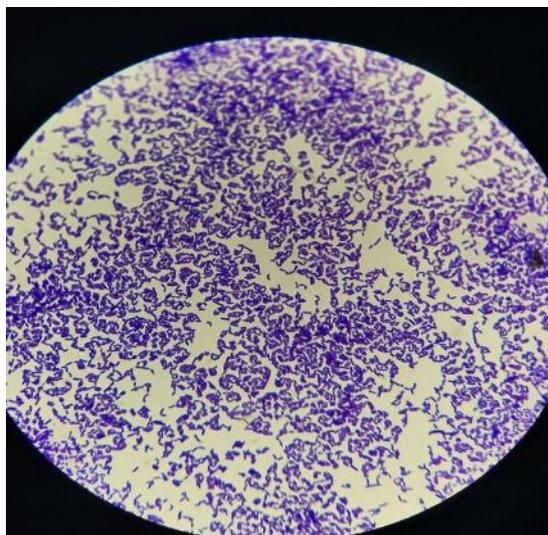


Рисунок 4 – Лактобактерии под световым микроскопом, окраска по Граму (увеличение 15x90)

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).

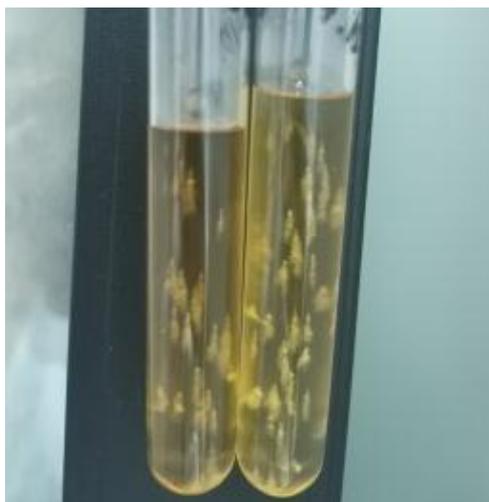
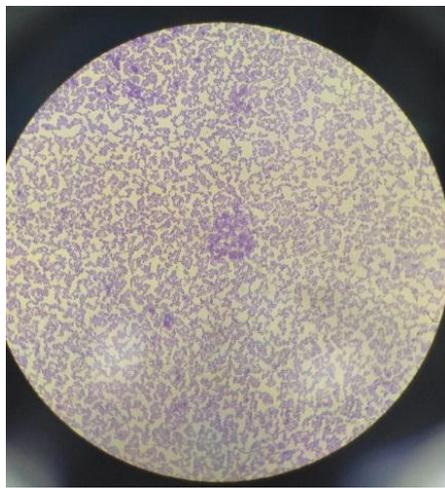


Рисунок 5 – Рост *L. plantarum* в полужидкой питательной среде

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



А



Б

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.

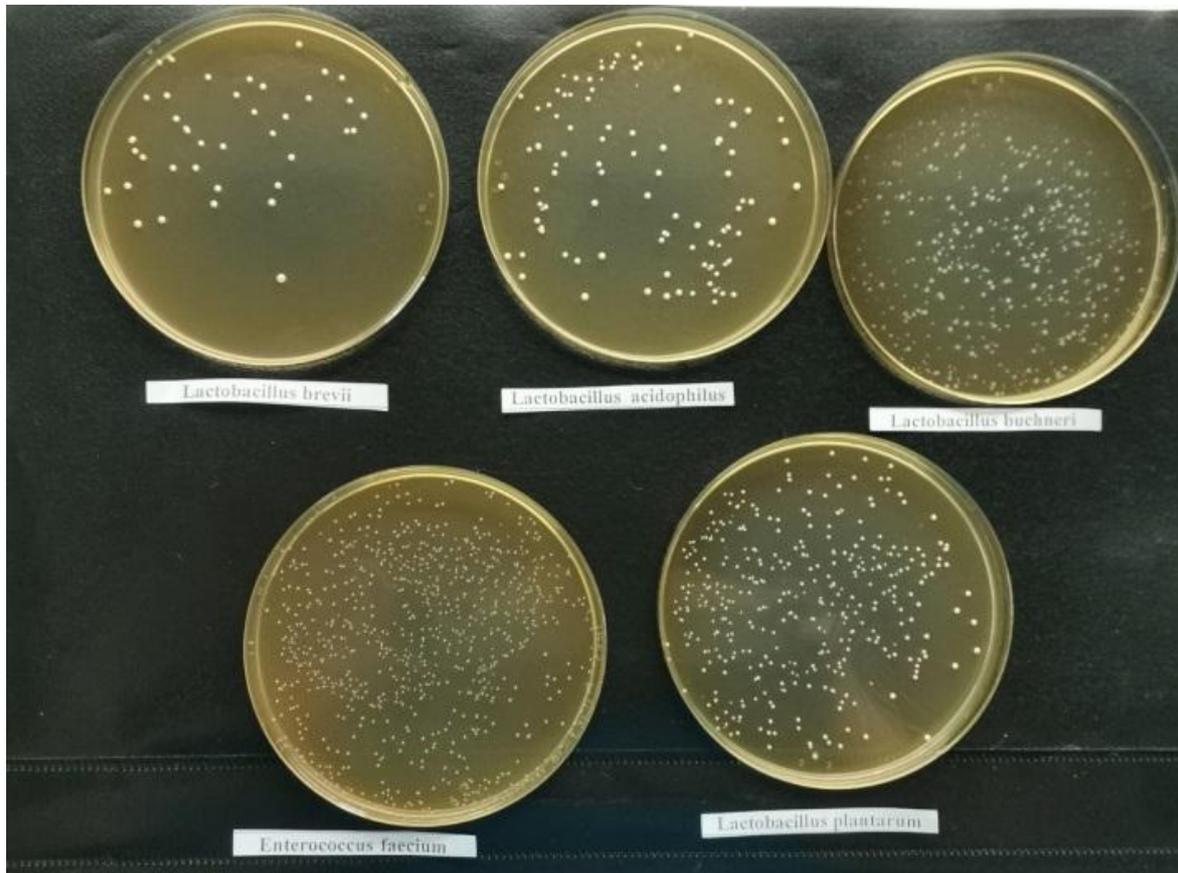


Рисунок 7 – Рост на чашках Петри разных видов *Lactobacillus* spp.

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).

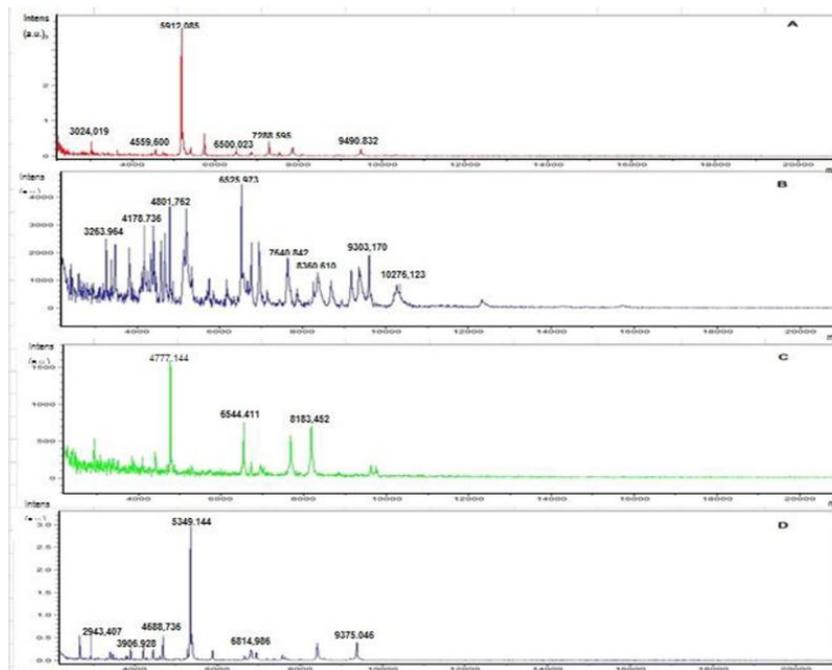


Рисунок 9 – График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK[®] MS

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).

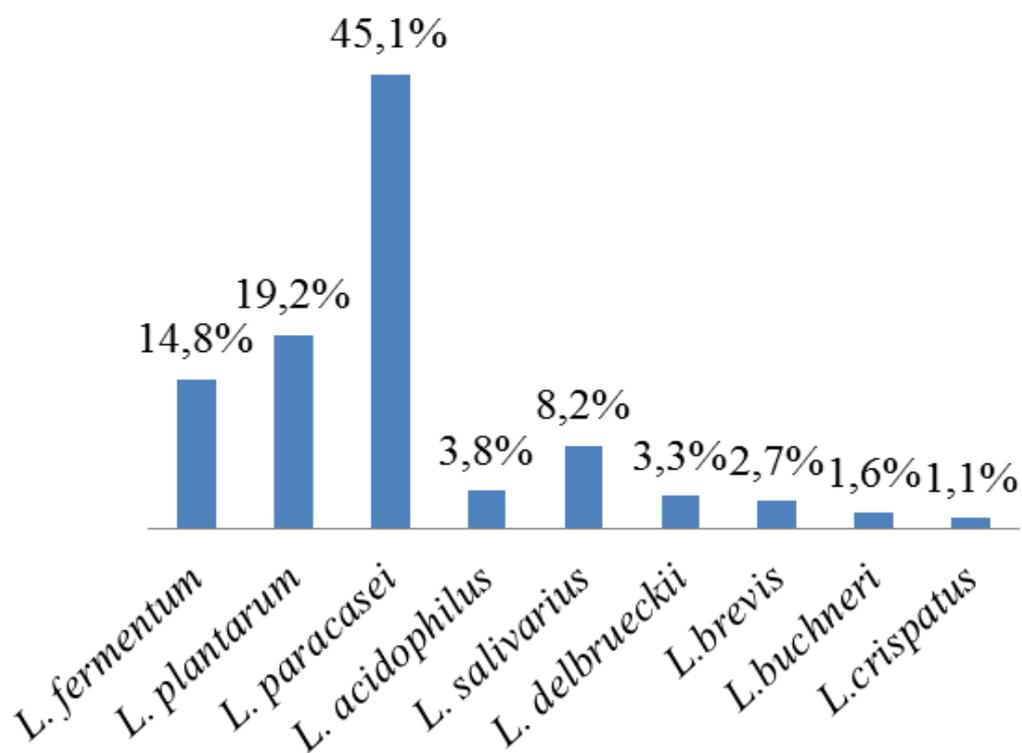


Рисунок 10 – Частота встречаемости разных видов *Lactobacillus* spp. при выделении из кишечника человека при дисбактериозах в данном исследовании

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.

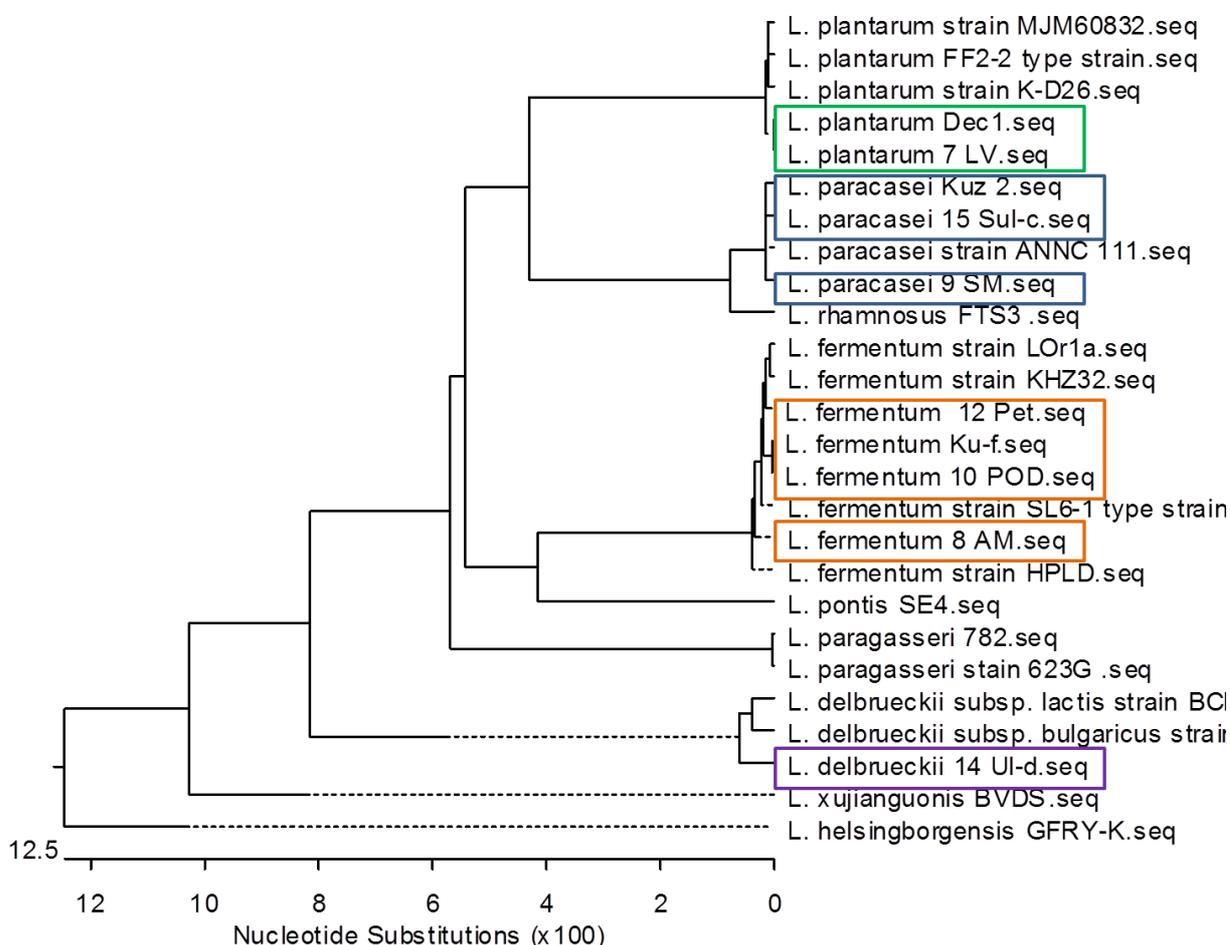


Рисунок 11 – Дендрограмма, построенная на основании анализа последовательности фрагмента гена 16S рНК исследуемых штаммов лактобацилл

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).

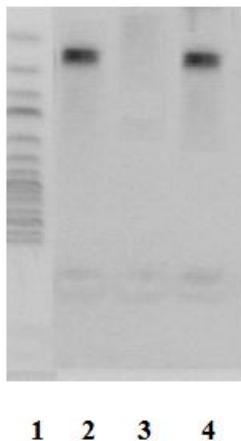


Рисунок 12 – Результаты ПЦР-анализа исследуемого штамма: 1. Маркер O'GeneRuler 1kbp DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п.н, сверху вниз); 2. ПЦР анализ исследуемого штамма с использованием праймеров LU-5 и Lac-2; 3. ПЦР-анализ исследуемого штамма с использованием праймеров LU-5 и RhaII; 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 ($\text{ИАМ} \geq 40,0$) 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).

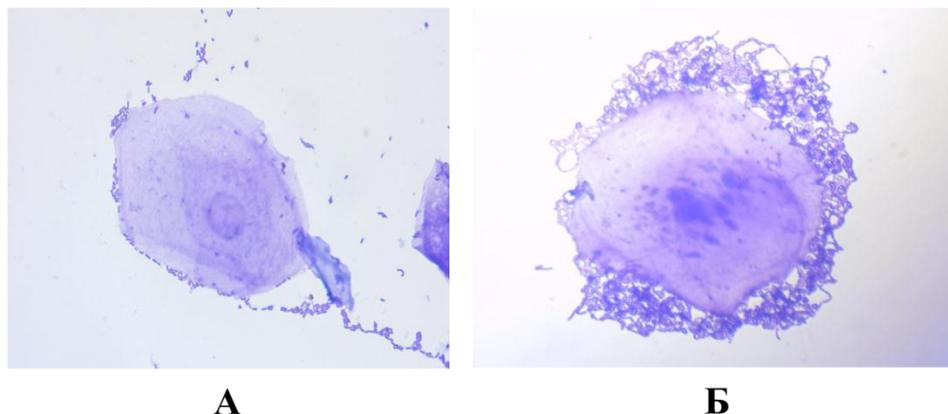


Рисунок 13 – Адгезия *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию. А – низкий индекс адгезии к эпителиоцитам (ИАМ $\geq 10,5 - 20,5$); Б – высокий индекс адгезии к эпителиоцитам (ИАМ ≥ 40).

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 Ul-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).

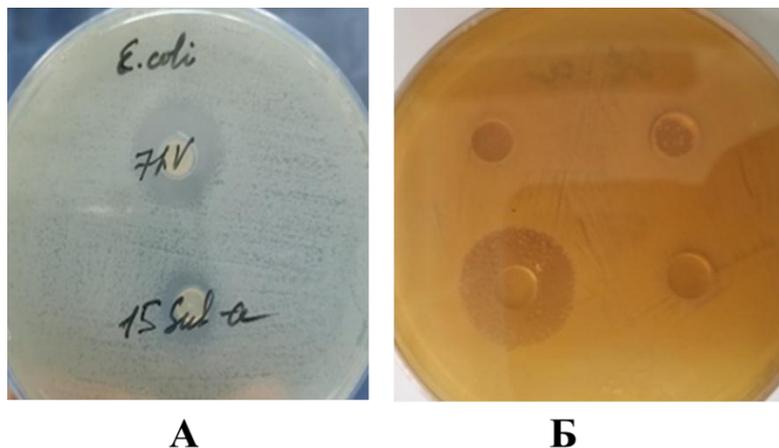


Рисунок 14 – Проверка антагонизма аутоштаммов лактобактерий к УПМ: *E. coli* (А) и *S. aureus* (Б) методом блоков

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>	22±1	24±3	3,2*10 ⁸

12 Pet			
<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).

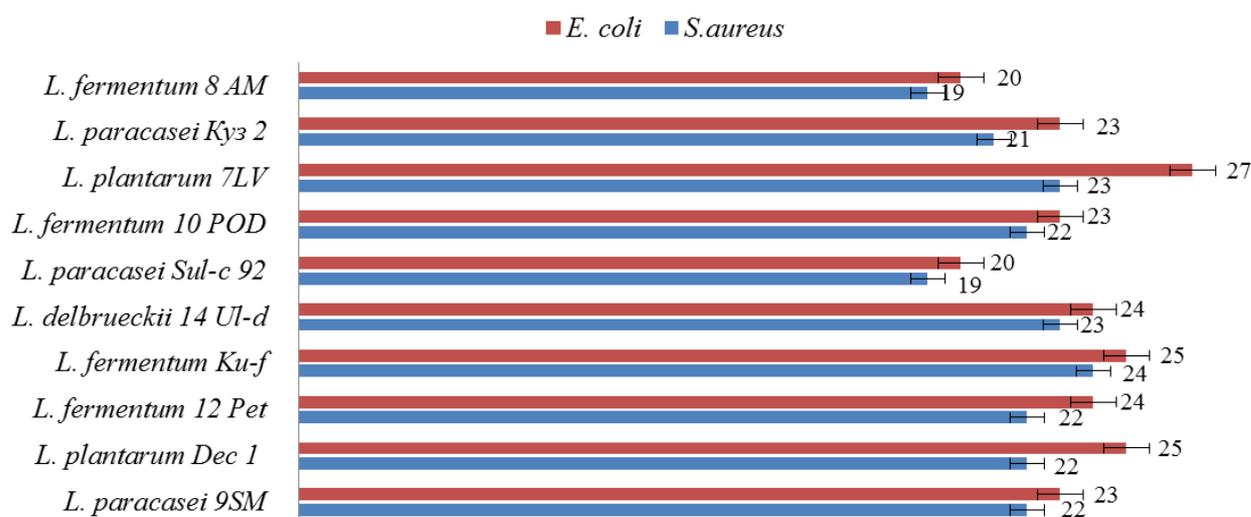
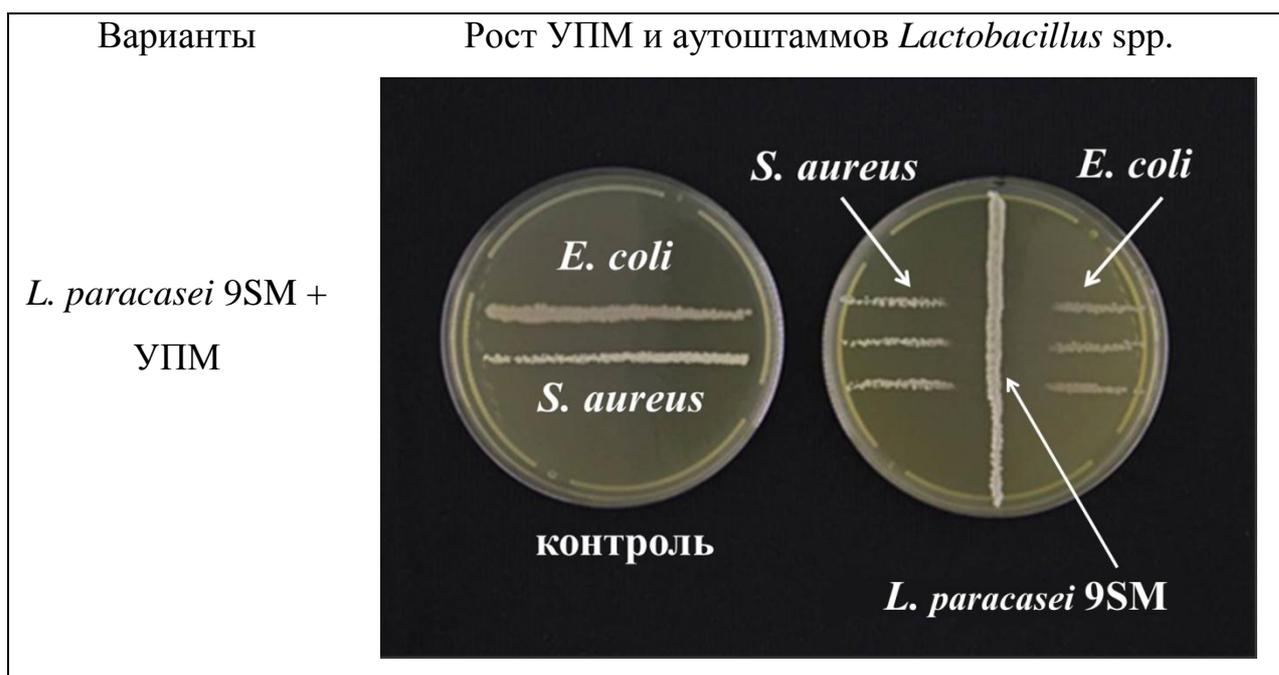


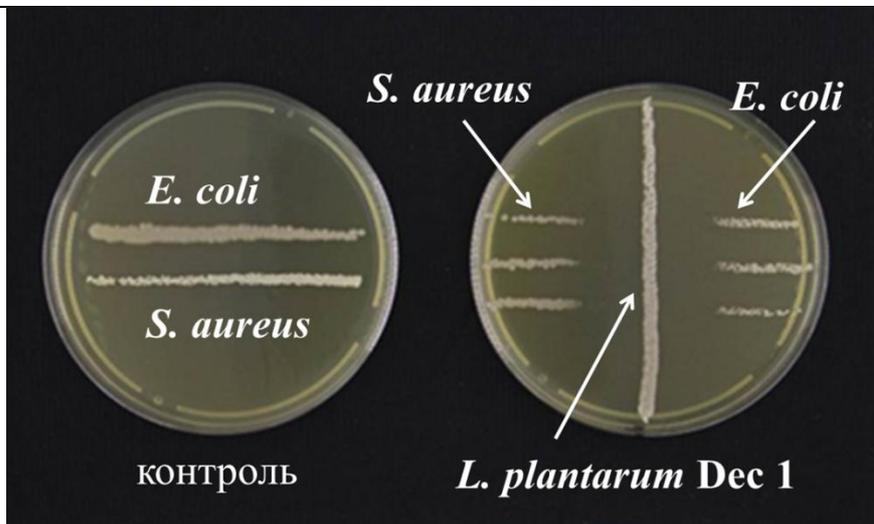
Рисунок 15 – Зона подавления условно-патогенных *S. aureus* и *E. coli* разными аутоштаммами *Lactobacillus* spp. (в мм)

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.

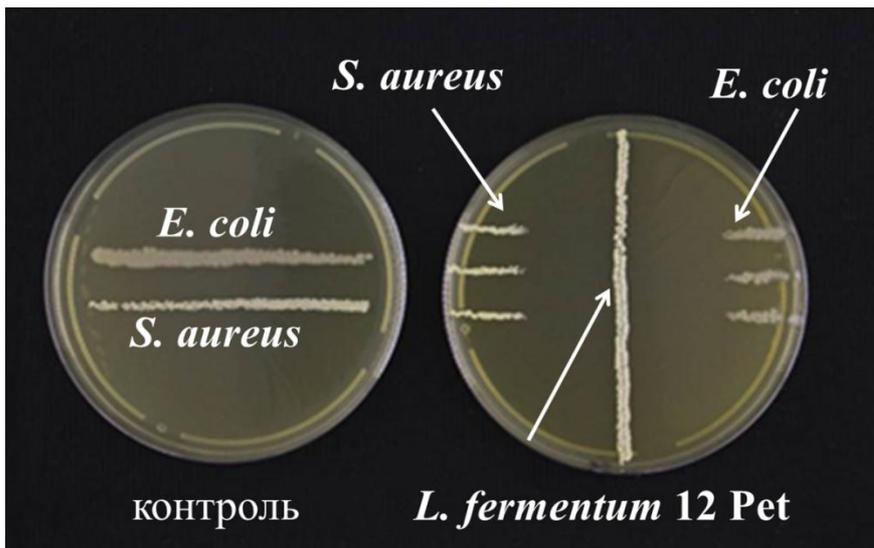
Таблица 7 – Визуальный рост УПМ и аутоштаммов *Lactobacillus* spp.



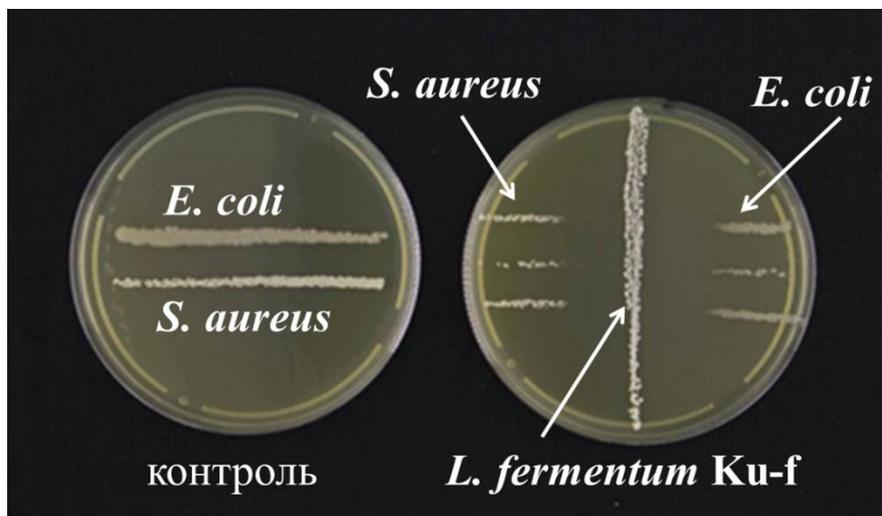
L. plantarum Dec 1
+ УПМ



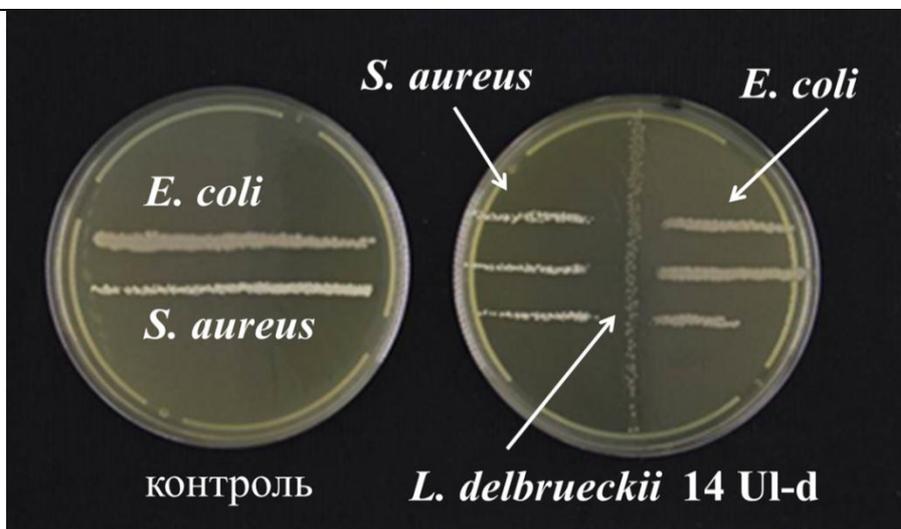
L. fermentum 12 Pet
+ УПМ



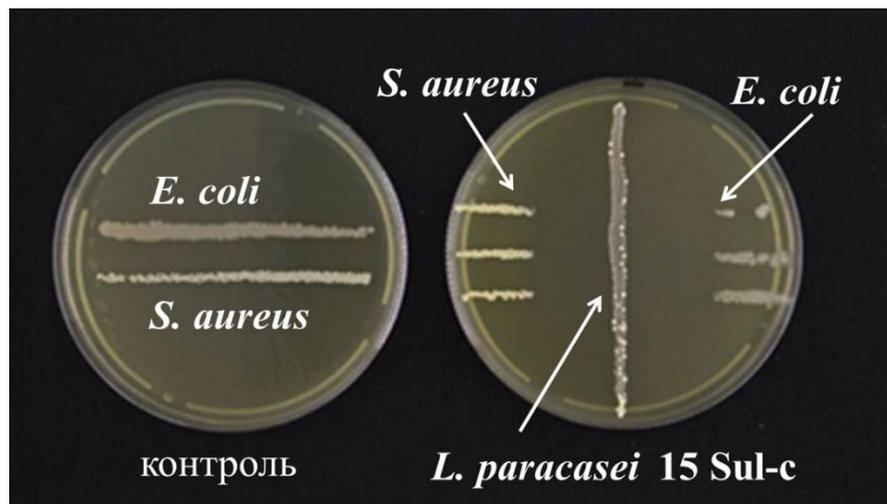
L. fermentum Ku-f
+ УПМ



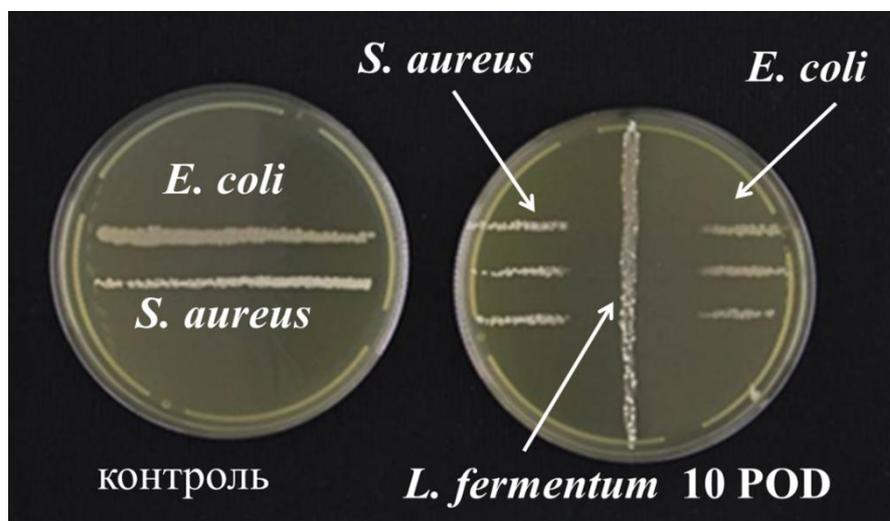
L. delbrueckii
14 UI-d + УПМ



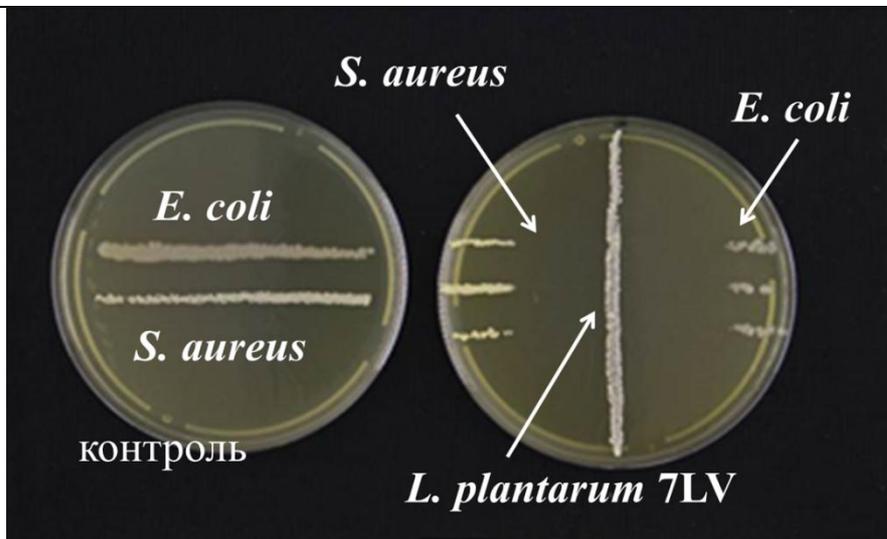
L. paracasei
15 Sul-c + УПМ



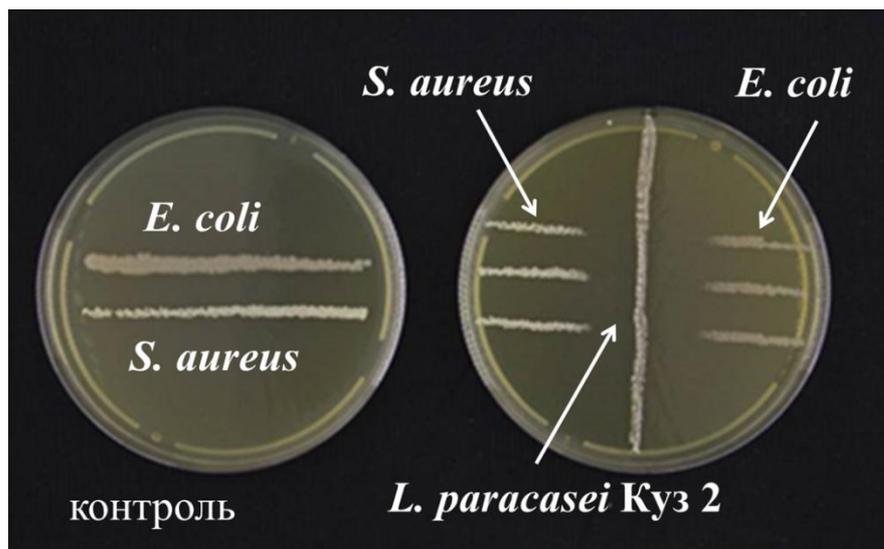
L. fermentum
10 POD + УПМ



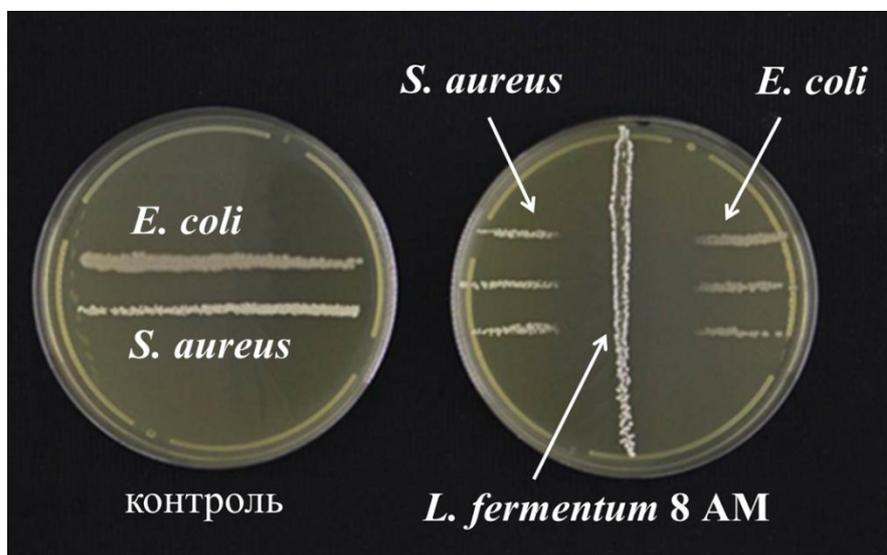
L. plantarum 7LV +
УПМ



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

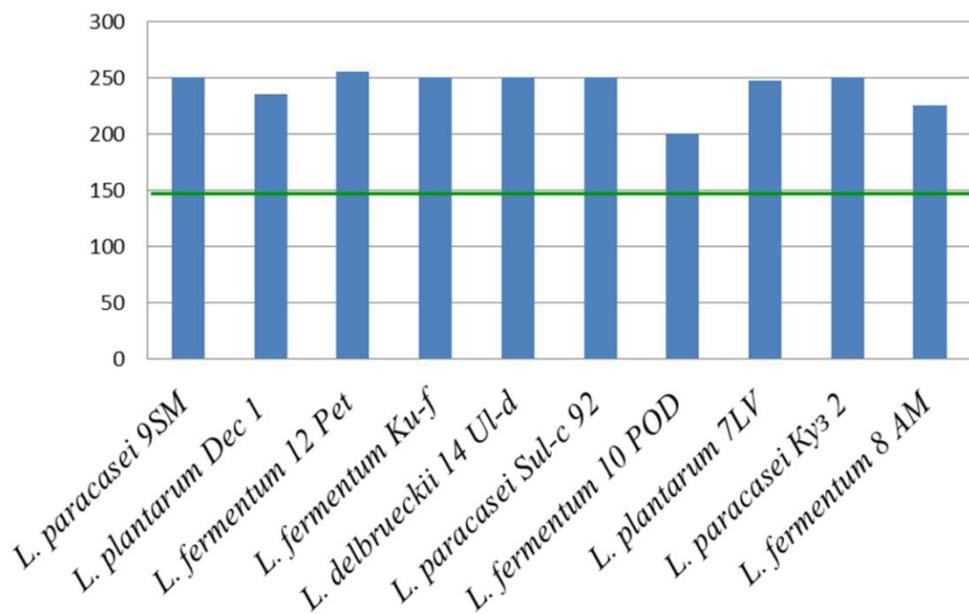


Рисунок 16 – Кислотообразующая активность аутоштаммов *Lactobacillus* spp. (более 150.0 °T – высокая активность)

Учет результатов проводили согласно полученным данным, где кислотообразование выше 150.0 °T 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, левомецетин (ЛЕВ) 30 мкг.

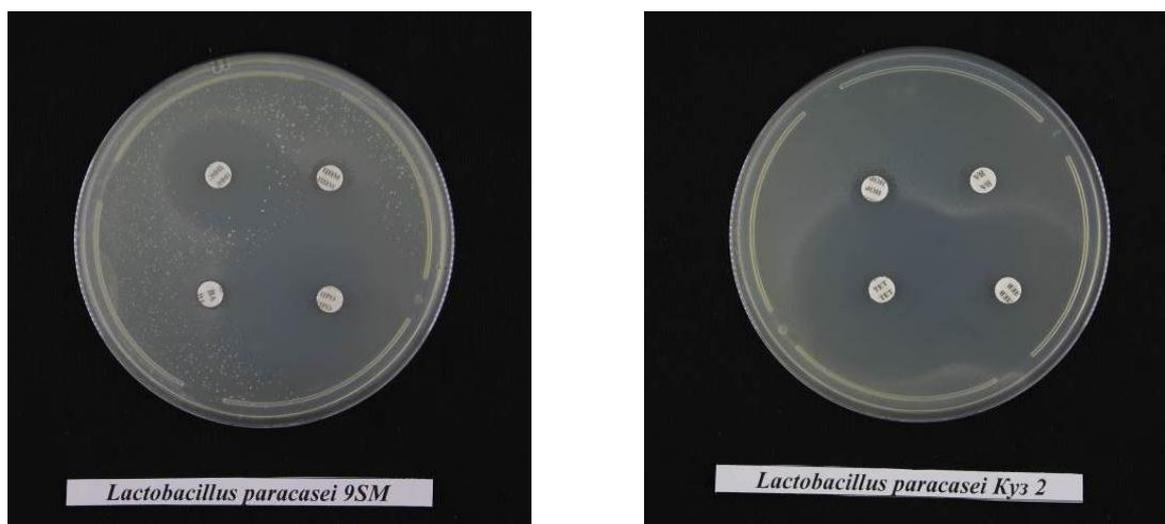


Рисунок 17 – Антибиотикочувствительность на чашках Петри ДДМ-методом.

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.</i> <i>paracasei</i>	№7 7LV <i>L.</i> <i>plantarum</i>	№8 10 POD <i>L.</i> <i>fermentum</i>	№9 14 Ul-d <i>L.</i> <i>delbrueckii</i>	№10 15 Sul-c <i>L.</i> <i>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
Левифлоксацин (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).

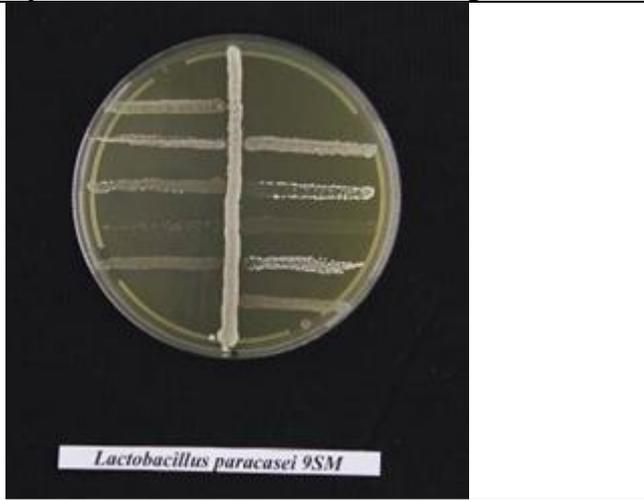
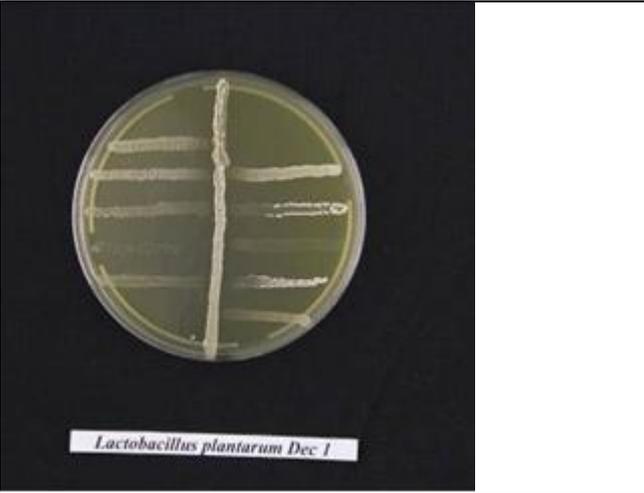
Таблица 11 – Биосовместимость аутоштаммов *Lactobacillus* spp.

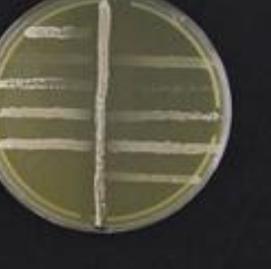
<i>Lactobacillus</i> spp.	9SM	Dec 1	8 AM	12 Pet	Ku-f	Куз 2	7LV	10 POD	14 Ul-d	15 Sul-c
9SM		+	+	+	-**	+	-	+	+	+
Dec 1	+		+	+	-	-	-	+	+	-
8 AM	+	+		+	-	-	-	-	+	-
12 Pet	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Ku-f	-	-	-	+		+	+	+	+	+
Куз 2	+	-	-	+	+		-	+	+	+
7LV	+	-	-	+	-	-		+	+	-
10 POD	+	+	-	+	+	+	+		-	+
14 Ul-d	+	+	+	+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

+* – положительная биосовместимость

-* – есть зона задержки роста

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

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

<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>8 <i>L. fermentum</i> 10POD</p>			
<p>9 <i>L. delbrueckii</i> 14 U1-d</p>			
<p>10 <i>L. paracasei</i> 15 Sul-c</p>			

При исследовании межштамовой 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* Куз 2, *L. paracasei* 15 Sul-c и *L. plantarum* 7LV;
- 3) *L. fermentum* 8 AM – *L. fermentum* Ku-f, *L. paracasei* Куз 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* Куз 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* Куз 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.

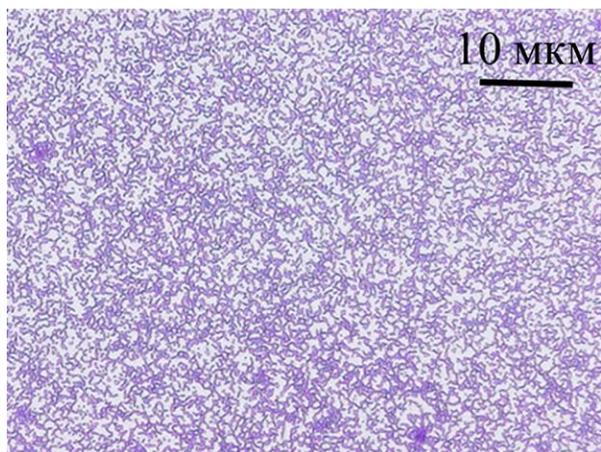


Рисунок 18 – Биопленки под микроскопом Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Germany)

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 <i>Lactobacillus</i> spp.	3 сут	1 нед	2 нед
<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> Куз 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

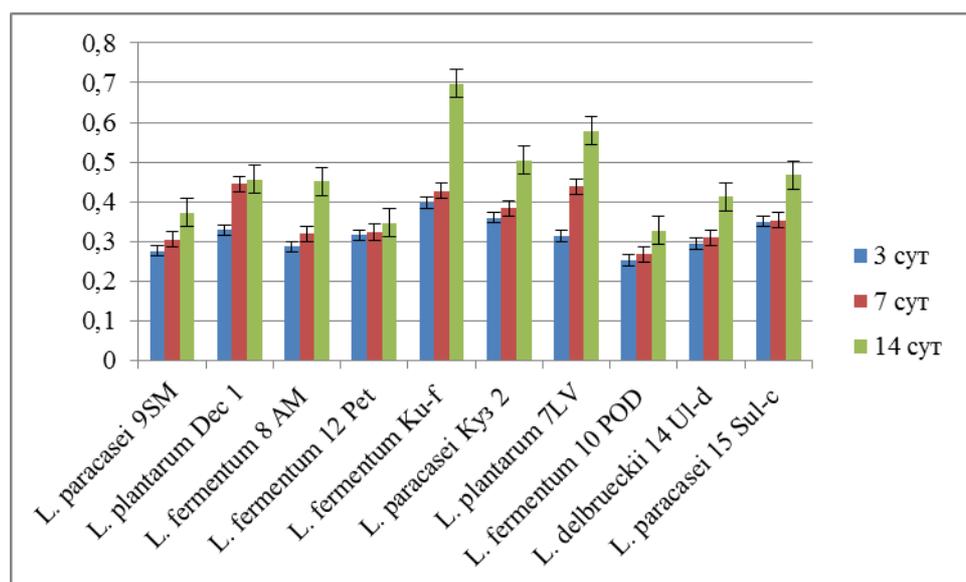


Рисунок 19 – Сравнение изменений в относительной биомассе биопленок аутоштаммов *Lactobacillus* spp. в 3-х периодах

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* Ку-ф и *L. paracasei* Куз 2; через 7 дней – *L. plantarum* Dec 1 и *L. fermentum* Ку-ф; через 2 недели самый высокий показатель у аутоштамма *L. fermentum* Ку-ф, средний показатель у – *L. paracasei* Куз 2 и *L. plantarum* 7LV. В результате *L. fermentum* Ку-ф 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 UI-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>	Куз 2	17,1%
10	<i>L. fermentum</i>	8 AM	15,7%

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

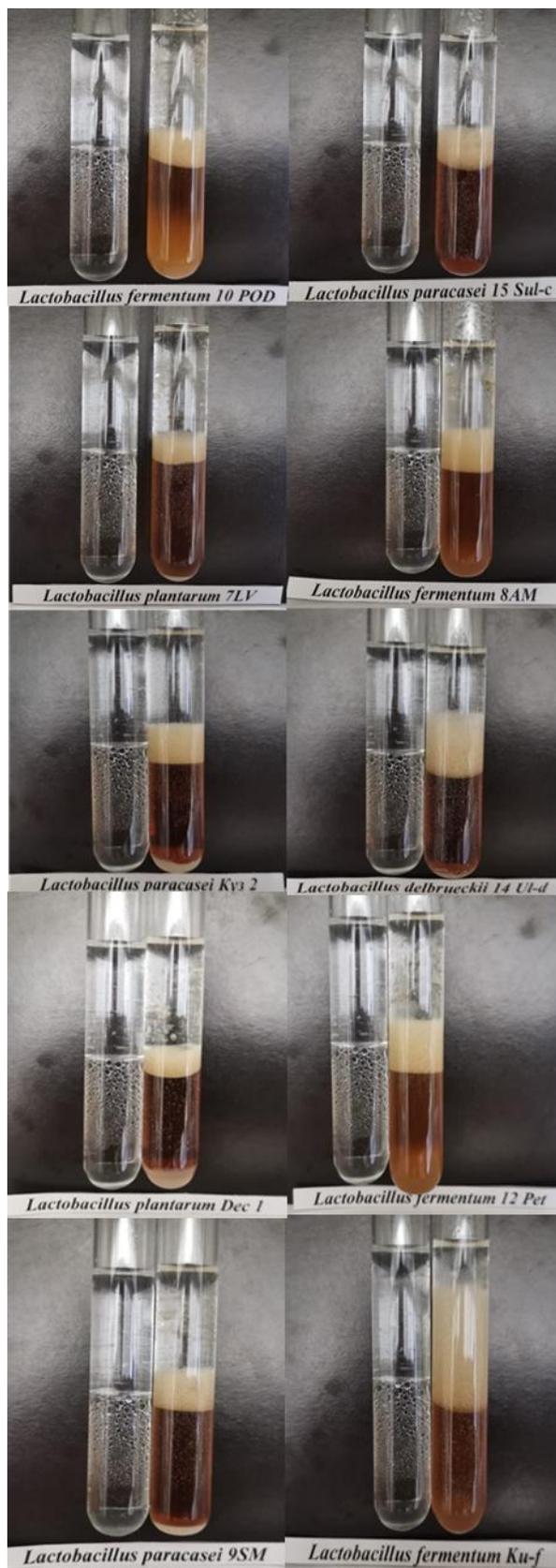


Рисунок 20 – Активность эмульгирования штаммов *Lactobacillus* spp.: 1-ая пробирка контроль – вода с гексадеканом, 2-ая пробирка – изучаемый штамм с гексадеканом

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; Banat, 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 *gcsR* 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 Солко (*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., Benítez-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. Bäumlér 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 quorum sensing 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., Muñoz-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. Gourbeyre 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-1beta 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 administered 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., Garcı´a 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.

Отчет о проверке на заимствования №1



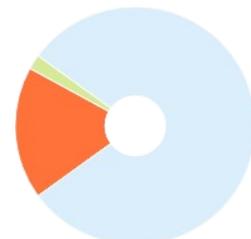
Автор: Потапова Светлана Михайловна
 Проверяющий: Халитова Рита Камилевна
 Организация: Башкирский государственный медицинский университет
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» – <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 2339
 Начало загрузки: 06.06.2023 14:00:15
 Длительность загрузки: 00:00:27
 Имя исходного файла: ВКР_Потапова С.М.РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФОРМИРОВАНИЯ .doc
 Название документа: ВКР_Потапова С.М.РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФОРМИРОВАНИЯ
 Размер текста: 143 кБ
 Тип документа: Выпускная квалификационная работа
 Символов в тексте: 146185
 Слов в тексте: 17648
 Число предложений: 2540

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 06.06.2023 14:00:43
 Длительность проверки: 00:23:04
 Корректировка от 06.06.2023 15:01:20
 Комментарии: [Автосохраненная версия]
 Поиск с учетом редактирования: да
 Проверенные разделы: основная часть с. 1–97, библиография с. 98–117
 Модули поиска: eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НБУ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, 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, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



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.

Цитирования — 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]	23,51%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	
[02]	5,84%	0,03%	https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambri... https://cambridge.org			https://pandia.ru Методы определения антагонистической активност... https://pandia.ru
[03]	5,57%	0%	Sources, isolation, characterisation and evaluation of p... https://doi.org			
[04]	5,24%	0,04%	https://escholarship.org/content/qt3h0532hz/qt3h053... https://escholarship.org			
[05]	4,95%	0%	Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver o... https://doi.org			
[06]	4,46%	0,14%	2887240x.pdf http://digibug.ugr.es			
[07]	4,42%	2,57%	https://esu.citis.ru/ikrbs/YBEN2Q2RBj18VPVWDKNj6MCZ https://esu.citis.ru			
[08]	2,72%	0,49%	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ... https://science-education.ru			
[09]	2,32%	0,06%	Методы определения антагонистической активност...			
[10]	2,32%	0%				
[11]	2,32%	0%				

06 Июн 2023	Интернет Плюс*	26 Фев 2018	Интернет Плюс*
06 Июн 2023	Интернет Плюс*	раньше 2011	Интернет Плюс*
06 Июн 2023	Интернет Плюс*	06 Июн 2023	Интернет Плюс*
06 Июн 2023	Интернет Плюс*	26 Июн 2022	Интернет Плюс*
		16 Фев 2021	Интернет Плюс*
<input type="text"/>	Методы определения антагонистической активност... https://pandia.ru	08 Июн 2021	Интернет Плюс*

[12]	2,32%	0%	Методы определения антагонистической активност... https://pandia.ru	26 Мая 2022	Интернет Плюс*	
[13]	2,32%	0%	https://igc.by/wp-content/uploads/2021/12/%D0%B1%... https://igc.by	28 Дек 2021	Интернет Плюс*	
[14]	2,23%	0,12%	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ... https://science-education.ru	06 Мар 2023	Интернет Плюс*	
[15]	2,23%	0%	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ... https://science-education.ru	30 Мая 2022	Интернет Плюс*	
[16]	2,22%	2,22%	Методы определения антагонистической активност... http://pandia.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[17]	2,1%	0%	Probiotic Mechanisms of Action – FullText – Annals of N... https://karger.com	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[18]	2,1%	0%	Probiotic Mechanisms of Action – FullText – Annals of N... https://karger.com	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[19]	2,04%	0%	Методы определения антагонистической активност... https://pandia.ru	11 Ноя 2020	Интернет Плюс*	
[20]	2,04%	0%	Методы определения антагонистической активност... https://pandia.ru	26 Мая 2022	Интернет Плюс*	
[21]	2%	1,62%	Информация Министерства здравоохранения РФ от... http://ivo.garant.ru	13 Окт 2013	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	
[22]	1,99%	0%	Изучение биологических свойств новых штаммов ... https://cyberleninka.ru	02 Авг 2021	Интернет Плюс*	
[23]	1,99%	0%	Изучение биологических свойств новых штаммов ... https://cyberleninka.ru	26 Мая 2022	Интернет Плюс*	
[24]	1,97%	0%	Full text http://izvestia.asu.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[25]	1,97%	0,41%	Точилина, Анна Георгиевна диссертация ... кандидат... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[26]	1,89%	0,62%	Государственная фармакопея Российской Федерац... https://base.garant.ru	15 Окт 2020	Интернет Плюс*	
[27]	1,87%	1,74%	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ШТ... http://cyberleninka.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[28]	1,76%	0%	Probiotic Mechanisms of Action – FullText – Annals of N... https://karger.com	21 Мар 2022	Интернет Плюс*	
[29]	1,76%	0%	Probiotic Mechanisms of Action – FullText – Annals of N... https://karger.com	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[30]	1,75%	0%	не указано http://unn.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[31]	1,68%	1,68%	МИКРОБНАЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ... https://elibrary.ru	16 Июл 2022	eLIBRARY.RU	
[32]	1,58%	1,11%	СПОСОБ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ПРОБИОТ... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	eLIBRARY.RU	
[33]	1,57%	0,24%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	28 Мая 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	
[34]	1,57%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	28 Мая 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	
[35]	1,54%	0%	https://kpfu.ru/portal/docs/F_1467650834/163_2_est_2... https://kpfu.ru	15 Ноя 2022	Интернет Плюс*	
[36]	1,5%	0,01%	БИОСУРФАКТАНТЫ: СОВРЕМЕННЫЕ ТРЕНДЫ ПРИМ... https://cyberleninka.ru	20 Июн 2022	Интернет Плюс*	
[37]	1,43%	0%	Biological strategies for the prevention of periodontal ... https://doi.org	31 Окт 2020	Издательство Wiley	
[38]	1,42%	0%	СПОСОБ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ПРОБИОТ... https://patenton.ru	02 Авг 2021	Интернет Плюс*	
[39]	1,41%	0%	Микробиота как ключ к стратегии выживания чело... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	
[40]	1,35%	0,31%	СПОСОБ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ПРОБИОТ... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[41]	1,34%	0%	Способ индивидуального подбора пробиотических... http://findpatent.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[42]	1,33%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	26 Апр 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	
[43]	1,26%	0,08%	Соловьева, Ирина Владленовна диссертация ... докт... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	
[44]	1,25%	0%	Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoi... https://doi.org	30 Сен 2017	Издательство Wiley	
[45]	1,15%	0,32%	https://gorskigau.com/Portals/0/%D0%9D%D0%90%D... https://gorskigau.com	24 Окт 2022	Интернет Плюс*	
[46]	1,07%	0%	Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental D... https://frontiersin.org	19 Сен 2020	СМИ России и СНГ	
[47]	1,06%	0%	Оптимизация метода определения антагонистичес... http://elibrary.ru	27 Мая 2019	eLIBRARY.RU	
[48]	1,05%	0,61%	Выделение и отбор местных штаммов лактобактер... http://diss.natlib.uz	07 Окт 2021	Коллекция НБУ	
[49]	0,99%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... https://base.garant.ru	18 Авг 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,96%	0,96%	Соловьева, Юлия Владимировна Клевера высокого... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Сводная коллекция РГБ	
[51]	0,95%	0%	№ 7 (143) 2017 http://nogr.org	25 Июн 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,95%	0%	Рищук, Сергей Владимирович диссертация ... докто... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	

[53]	0,94%	0%	№ 4 (5) http://emll.ru	28 Апр 2017	Медицина	
[54]	0,92%	0,08%	ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММА МОЛОЧНОКИСЛЫХ ... https://science-education.ru	11 Окт 2022	Интернет Плюс*	
[55]	0,92%	0%	http://www.rishchuk.ru/pdf/bojtsovrischuk-i-dr-adgezi... http://rishchuk.ru	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[56]	0,9%	0,9%	СИНДРОМ НАРУШЕНИЯ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗ... http://cyberleninka.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[57]	0,9%	0%	Синдром нарушения колонизационной резистентн... http://elibrary.ru	27 Дек 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[58]	0,89%	0,01%	2.2. Пробирочный метод учета колоний в полужидк... http://studfiles.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[59]	0,88%	0%	https://gorskigau.com/Portals/0/%D0%9D%D0%90%D... https://gorskigau.com	27 Мая 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,88%	0%	Mechanisms of Action of Probiotics Advances in Nutri... https://academic.oup.com	04 Июн 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,87%	0%	Определение специфической активности пробиоти... https://pandia.ru	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[62]	0,84%	0,11%	СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АУТОПРОБИОТИКА, СОДЕРЖА... http://elibrary.ru	01 Янв 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[63]	0,81%	0%	2022 ТППИТ ЛП Машенко З.Е. Биотехнология преп... http://studfiles.ru	30 Ноя 2022	Кольцо вузов	
[64]	0,8%	0%	Differential modification of genetic susceptibility to chil... https://doi.org	31 Окт 2014	Издательство Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,79%	0%	CANDIDA SPP. И МИКРОБОЦЕНОЗ ПОЛОСТИ РТА У Д... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	
[66]	0,77%	0%	Intestinal Dysbiosis in, and Enteral Bacterial Therapies f... https://frontiersin.org	28 Окт 2020	СМИ России и СНГ	
[67]	0,76%	0%	СИНДРОМ ПОВЫШЕННОЙ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ПРОН... https://cyberleninka.ru	12 Мая 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,74%	0,74%	БИОСУРФАКТАНТЫ: СОВРЕМЕННЫЕ ТРЕНДЫ ПРИМ... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	
[69]	0,73%	0,73%	СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АУТОПРОБИОТИКА, СОДЕРЖА... http://elibrary.ru	01 Янв 2015	eLIBRARY.RU	
[70]	0,73%	0%	Способ получения аутопробиотика, содержащего ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[71]	0,72%	0%	Diplom_Shapovalov_fmmb_360401_2023	11 Мая 2023	Кольцо вузов	
[72]	0,72%	0,26%	Способ оценки биологической активности лактоба... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[73]	0,72%	0%	Gut Microbiome and Metabolome Were Altered and St... https://frontiersin.org	07 Авг 2020	СМИ России и СНГ	
[74]	0,72%	0%	Антибиотики и химиотерапевтические препараты : ... http://bibliorossica.com	27 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	
[75]	0,72%	0%	270294 http://biblioclub.ru	20 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	
[76]	0,69%	0%	Чжун Синь Дифференциально-диагностические сво... http://dlib.rsl.ru	22 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	
[77]	0,69%	0%	Probiotics in Disease Prevention and Treatment https://doi.org	31 Окт 2018	Издательство Wiley	
[78]	0,68%	0%	A probiotic modulates the microbiome and immunity i... https://doi.org	30 Июн 2018	Издательство Wiley	
[79]	0,67%	0%	Probiotic Mechanisms of Action – FullText – Annals of N... https://karger.com	08 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	
[80]	0,67%	0%	Бельский, Дмитрий Владимирович диссертация ... к... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2012	Сводная коллекция РГБ	
[81]	0,66%	0%	Способ получения аутопробиотика, содержащего ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[82]	0,66%	0%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,65%	0%	Современные подходы к этиотропной терапии вне... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	
[84]	0,65%	0%	Антибиотики. http://elibrary.ru	19 Дек 2015	eLIBRARY.RU	
[85]	0,65%	0,59%	Методические указания МУК 4.2.1 890–04 "Опреде... http://ivo.garant.ru	09 Апр 2005	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	
[86]	0,65%	0%	Микробиология, вирусология и иммунология: руко... http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[87]	0,65%	0%	Микробиология, вирусология и иммунология: руко... http://studentlibrary.ru	20 Дек 2016	Медицина	
[88]	0,65%	0%	Микробиология, вирусология и иммунология: руко... http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	
[89]	0,65%	0%	Кругликов, Владимир Дмитриевич Научное обосо... http://dlib.rsl.ru	12 Окт 2017	Сводная коллекция РГБ	
[90]	0,63%	0%	Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, ... https://frontiersin.org	20 Ноя 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,63%	0,03%	Диссертация на соискание ученой степени доктора ... http://microbe.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[92]	0,62%	0%	МУК 4.2.1 890–04 Определение чувствительности ми... http://docs.cntd.ru	27 Апр 2022	Интернет Плюс*	
[93]	0,59%	0%	Кириленко, Марина Александровна Оценка свойств ... http://dlib.rsl.ru	09 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	
[94]	0,58%	0,4%	Диссертация (2/6) http://iegm.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	

[95]	0,58%	0%	Beneficial effects of probiotics in upper respiratory trac... https://doi.org	31 Дек 2012	Издательство Wiley	
[96]	0,54%	0%	Фенотипические и генотипические характеристики... http://diss.natlib.uz	02 Июл 2020	Коллекция НБУ	
[97]	0,54%	0%	Основы микробиологии, вирусологии, иммунологии http://studentlibrary.ru	27 Ноя 2017	Сводная коллекция ЭБС	
[98]	0,52%	0%	Основы микробиологии и иммунологии (для СПО) https://book.ru	03 Июл 2017	Сводная коллекция ЭБС	
[99]	0,51%	0%	Мир микробов и человек. http://elibrary.ru	03 Дек 2015	eLIBRARY.RU	
[100]	0,51%	0%	Whole Body Vibration Triggers a Change in the Mutual ... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	
[101]	0,51%	0%	Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interac... https://frontiersin.org	09 Фев 2021	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,49%	0%	https://newjournal.ssmu.kz/upload/iblock/479/nauka_i... https://newjournal.ssmu.kz	26 Мая 2023	Интернет Плюс*	
[103]	0,48%	0,32%	Резистентность штаммов <i>Neisseria gonorrhoe... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[104]	0,48%	0,06%	Инновации в современной науке. http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[105]	0,46%	0%	Regulation of Gut Microbiota on Immune Reconstituti... https://frontiersin.org	27 Окт 2020	СМИ России и СНГ	
[106]	0,44%	0%	The immune response to Prevotella bacteria in chronic ... https://doi.org	31 Авг 2017	Издательство Wiley	
[107]	0,43%	0%	Кабисов, Руслан Гельбертович диссертация ... докто... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	0,42%	0%	Способ индивидуального подбора пробиотических... http://findpatent.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[109]	0,41%	0%	Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Dis... https://frontiersin.org	22 Мая 2020	СМИ России и СНГ	
[110]	0,39%	0,07%	A Critical Evaluation of Bifidobacterial Adhesion to the ... https://frontiersin.org	22 Мая 2020	СМИ России и СНГ	
[111]	0,37%	0%	Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update https://frontiersin.org	05 Фев 2021	СМИ России и СНГ	
[112]	0,37%	0%	Ханов	02 Окт 2019	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,35%	0%	ИЗУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ... http://elibrary.ru	13 Янв 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,35%	0%	Столбова, Мария Георгиевна Разработка лекарстве... http://dlib.rsl.ru	08 Ноя 2019	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,33%	0%	Исследование выделенных микроорганизмов на по... http://elibrary.ru	19 Сен 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[116]	0,33%	0%	СБОРНИК 1 http://aeterna-ufa.ru	28 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[117]	0,33%	0%	Использование защитных культур. Теоретические ... http://elibrary.ru	08 Окт 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[118]	0,32%	0,32%	Нигматуллина, Лилия Ралисовна Бактериальный ад... http://dlib.rsl.ru	11 Июн 2020	Сводная коллекция РГБ	
[119]	0,32%	0%	Gut microbiome is associated with multiple sclerosis ac... https://doi.org	30 Сен 2021	Издательство Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,32%	0%	Mechanisms of probiotic action: Implications for thera... https://doi.org	30 Ноя 2008	Издательство Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,31%	0%	АДГЕЗИЯ CANDIDA ALBICANS НА БУККАЛЬНЫХ ЭПИТ... http://elibrary.ru	01 Сен 2022	Кольцо вузов	
[122]	0,31%	0%	Болезни желудка http://studentlibrary.ru	26 Янв 2018	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0,31%	0%	Кротова, Ольга Евгеньевна Научно–практическое о... http://dlib.rsl.ru	08 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0,3%	0%	Microbiome alterations in HIV infection a review https://doi.org	31 Мая 2016	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	
[125]	0,3%	0%	Чаплин, Андрей Викторович Сравнительная геноми... http://dlib.rsl.ru	14 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0,29%	0%	EPS–SJ Exopolisaccharide Produced by the Strain Lacto... https://frontiersin.org	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	
[127]	0,28%	0%	Празднова, Евгения Валерьевна Антимутагенное де... http://dlib.rsl.ru	07 Сен 2020	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[128]	0,28%	0%	Пробиотики: актуальность и механизмы – Morigov... http://morigovo.org	06 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0,27%	0%	не указано http://ddd.uab.cat	04 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	
[130]	0,27%	0%	Ивашкина, Наталья Юрьевна диссертация ... доктор... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2015	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[131]	0,26%	0%	Способ ускоренного определения чувствительност... http://findpatent.ru	раньше 2011	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	0,26%	0%	Сравнительная значимых вариантов микробиолог... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[133]	0,26%	0%	DISRUPTION OF THE COLONIZATION RESISTANCE SYN... http://cyberleninka.ru	08 Янв 2018	Переводные заимствования (RuEn)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	0,26%	0%	Disruption of the Colonization Resistance Syndrome in ... http://elibrary.ru	04 Янв 2017	Переводные заимствования (RuEn)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[135]	0,26%	0%	In Vitro and in Vivo Selection of Potentially Probiotic La... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[136]	0,25%	0%	Bifidobacteria and Their Role as Members of the Huma... https://frontiersin.org	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	0,25%	0%	Bile Acids, Microbiota, and Metabolism https://doi.org	31 Окт 2018	Издательство Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	0,25%	0%	Microbial-Based Therapies in the Treatment of Inflamm... https://frontiersin.org	10 Июн 2020	СМИ России и СНГ	
[139]	0,25%	0%	Гульнева, Марина Юрьевна Особенности микроби... http://dlib.rsl.ru	25 Окт 2019	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[140]	0,25%	0,25%	Осипова, Ирина Григорьевна Экспериментально-к... http://dlib.rsl.ru	01 Фев 2013	Сводная коллекция РГБ	
[141]	0,25%	0%	Экспериментально-клиническое изучение споровы... http://earthpapers.net	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[142]	0,24%	0%	Бактериоцины Bifidobacterium adolescentis MC-42 и ... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[143]	0,23%	0%	Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for... https://frontiersin.org	03 Окт 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[144]	0,23%	0%	Выделение, селекция и характеристика биотехноло... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[145]	0,22%	0%	Модуляция функционального состояния сердца к... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[146]	0,21%	0%	Полужатова, Елена Александровна Синдром раздра... http://dlib.rsl.ru	25 Окт 2019	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[147]	0,21%	0,21%	114832 http://biblioclub.ru	14 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	
[148]	0,21%	0%	Beneficial Effects of Human Anti-Interleukin-15 Antibod... https://frontiersin.org	26 Янв 2021	СМИ России и СНГ	
[149]	0,2%	0%	Клинические рекомендации. Колопроктология http://studentlibrary.ru	26 Янв 2018	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[150]	0,2%	0%	Increasing Evidence That Irritable Bowel Syndrome and... https://frontiersin.org	09 Сен 2020	СМИ России и СНГ	
[151]	0,2%	0%	Моделирование биопленки у бактерий на плотной ... http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	
[152]	0,19%	0%	Клинические рекомендации. Колопроктология http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[153]	0,19%	0%	Способ определения адгезивных свойств бактерий ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[154]	0,19%	0%	Quorum sensing in group A Streptococcus https://frontiersin.org	21 Окт 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[155]	0,19%	0%	Вопросы практической педиатрии. 2017. Т. 12, № 5 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[156]	0,18%	0%	Тагирова, Аният Руфатовна Качество жизни у детей ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[157]	0,17%	0%	RUDFL173271(1)(108348)	10 Янв 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[158]	0,17%	0%	ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ... http://elibrary.ru	14 Дек 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[159]	0,17%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	05 Авг 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[160]	0,16%	0%	Стрельникова Н.В. статья_26.12.2022	27 Дек 2022	Кольцо вузов	
[161]	0,16%	0%	Т. 9, № 2 http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	
[162]	0,16%	0%	Advances in quantification and analysis of the celiac-re... https://doi.org	30 Сен 2021	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	
[163]	0,16%	0%	Генно-инженерные биологические препараты в ле... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[164]	0,16%	0%	Анисимова, Елизавета Алексеевна Антибиотикорези... http://dlib.rsl.ru	28 Дек 2021	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[165]	0,16%	0%	Пробиотические и бактериоциногенные свойства ... http://diss.natlib.uz	03 Авг 2018	Коллекция НБУ	
[166]	0,16%	0%	Method and System to Provide Personalized Pharmac... http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[167]	0,16%	0%	Factors Influencing Insulin Absorption Around Exercise... https://frontiersin.org	31 Янв 2022	СМИ России и СНГ	
[168]	0,15%	0%	Применение моделей клеточных культур при опис... http://diss.natlib.uz	19 Мар 2020	Коллекция НБУ	
[169]	0,15%	0%	Молекулярно-генетические и молекулярно-биолог... http://elibrary.ru	27 Авг 2014	eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[170]	0,15%	0%	Chiral diacylhydrazine ligands for modulating the expre... http://freepatentsonline.com	05 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[171]	0,14%	0%	Research progress on the regulation mechanism of pro... https://doi.org	31 Мая 2022	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[172]	0,14%	0%	Germ-Free Mice Exhibit Mast Cells With Impaired Funct... https://frontiersin.org	30 Июн 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[173]	0,14%	0%	Synbiotic Composition For Infants – N.V. NUTRICIA (2/2) http://freepatentsonline.com	07 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[174]	0,14%	0%	Микробиологические особенности и антимикробн... http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[175]	0,13%	0%	Клинические рекомендации "Синдром раздражён... http://ivo.garant.ru	06 Апр 2022	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[176]	0,13%	0%	Выращивание рыбопосадочного материала радуж... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[177]	0,13%	0%	Gut microbiome is associated with multiple sclerosis ac... https://doi.org	30 Сен 2021	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[178]	0,13%	0%	Применение пробиотиков для коррекции клинико-... http://emll.ru	20 Янв 2020	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[179]	0,13%	0%	Йодсодержащие тиреоидные гормоны в кариесрез... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[180]	0,13%	0%	Коронавирус COVID-19 http://ivo.garant.ru	08 Фев 2020	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[181]	0,13%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	05 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[182]	0,13%	0%	Статья Идиатуллина Г.А.	02 Дек 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[183]	0,13%	0%	Государственная фармакопея Российской Федерац... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[184]	0,13%	0%	Рецепция нутриентов в кишечнике крыс: функцион... http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[185]	0,12%	0%	Probiotics in the dairy industry—Advances and oport... http://ivo.garant.ru	01 Фев 2022	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[186]	0,12%	0%	PROBIOTIC BACTERIA – THE UNIVERSITY OF MANCHES... http://freepatentsonline.com	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[187]	0,12%	0%	№ 2, июнь http://emll.ru	28 Апр 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[188]	0,11%	0%	Рациональная антимикробная терапия http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[189]	0,11%	0%	Способ получения гомопробиотического бактерий... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[190]	0,1%	0%	Probiotic Interference of Lactobacillus rhamnosus GR-1... https://hindawi.com	05 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[191]	0,1%	0%	Избранные главы фундаментальной и трансляцион... https://e.lanbook.com	22 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[192]	0,1%	0%	Вопросы диетологии: научно-практический журнал... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[193]	0,1%	0%	Бактериальные инфекции в стационаре: поиск нов... http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[194]	0,1%	0%	Избранные главы фундаментальной и трансляцион... http://studentlibrary.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[195]	0,1%	0%	Стимуляция биологической активности гриба рода ... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[196]	0,1%	0%	116000 http://biblioclub.ru	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[197]	0,09%	0%	Клейчук Е. В. doc	14 Апр 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[198]	0,09%	0%	АНАЛИЗ ОТДАЛ_НЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОСОБЕНН...	11 Июн 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[199]	0,09%	0%	просм_Иммунология. КАЗАНЬ. Антиплагиат 2	15 Апр 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[200]	0,09%	0%	Сенсорная рецепция нутриентов в кишке под влиян... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[201]	0,09%	0%	Т. 10, № 3 http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[202]	0,09%	0%	МурзабаеваЭБ. Статья	12 Апр 2018	Модуль поиска "БГМУ"	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[203]	0,09%	0%	Т. 26, № 5 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[204]	0,09%	0%	Видовой состав бактерий порядка Bacteroidales в м... http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[205]	0,08%	0%	Изучение механизмов противовоспалительной акт... http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[206]	0,07%	0%	Pharmaceutical compositions containing pediococcus ... http://freepatentsonline.com	03 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[207]	0,07%	0%	Клинико-патогенетическое обоснование применен... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[208]	0,07%	0%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[209]	0,05%	0%	Т. 9, № 6 http://emll.ru			

