

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*

*Сайфутдинова ГР/Сайф*

**Сайфутдинова Гульшат Рауфовна**

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ  
МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент



Ан.Х. Баймиев

Уфа – 2024

**Список сокращений и условных обозначений**

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

БАД – биологически активные добавки

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

IgA – иммуноглобулин А

ЖСА – желточно-солевой агар

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

MALDI-TOF MS – матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Список сокращений и условных обозначений	
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b>	6
1.1. Нормофлора кишечника	6
1.2. Пробиотики	22
1.3. Дисбактериоз	26
1.4. Условно патогенные и патогенные бактерии ЖКТ	29
1.5. Симбиоз микрофлоры кишечника и человека	31
1.6. Механизм взаимодействия микрофлоры ЖКТ и человека	32
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	38
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ</b>	54
<b>ВЫВОДЫ</b>	68
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	69
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b>	72

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Химические и физические условия в различных отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) существенно отличаются. Из-за различий в составе, многообразии микробиоценоза варьируется и в динамике непостоянно. Микробиота является более изменчивой и зависит от скорости поступления пищевых субстратов по пищеварительному каналу, в частности пищевых волокон, которые являются питательным субстратом и играют роль матрицы, на которой фиксируются и образуют колонии кишечные бактерии. Нестабильность микробиоты кишечника человека зависит от нерационального питания, заболеваний и образа жизни человека. Обсемененность кишечника условно-патогенной и патогенной микрофлорой при заболеваниях ускоряет нарушение пищеварения, тормозит синтез витаминов, нарушает их циркуляцию с образованием токсичных веществ, повышает проницаемость эпителия стенок кишечника для бактерий, токсических продуктов, микро- и макромолекул. В свою очередь нарушения всех процессов при заболеваниях могут привести к изменению качественного и количественного состава микробиоты кишечника. Нарушения кишечных бактериальных сообществ в отделах ЖКТ влияют на здоровье человека, и одним из методов лечения является антибактериальные средства. Каждый класс антибиотиков имеет различные свойства, приводящие к изменениям микробиоты кишечника, и обладают индивидуальным сроком выведения из организма человека.

**Цель исследования:** исследовать наличие антибактериальных свойств штаммов бактерий из состава кишечной микрофлоры.

**Задачи исследования.**

1. Получить чистые культуры штаммов бактерий кишечной микрофлоры

2. Провести идентификацию полученных штаммов бактерий методом масс-спектрометрии
3. Оценить антибактериальные свойства бактерий и определить их механизм

**Обоснование новизны исследования.** Представленные в работе результаты расширяют имеющиеся знания об антибактериальных свойствах бактерий микробиоты кишечника, вносят вклад и формирование представлений о механизмах подавления роста патогенных бактерий.

**Теоретическая значимость и практическая ценность полученных результатов.** На основе полученных данных можно предположить новые направления в разработке эффективных методов лечения. Материалы выпускной квалификационной работы могут быть использованы при чтении курсов микробиологии на биологических факультетах университетов, в медицинских ВУЗах и на курсах повышения квалификации медицинских работников.

## Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Нормофлора кишечника

Основная суть нормофлоры заключается в определённом балансе между количеством и качеством различных микробных сообществ, которые заселяют разные органы и системы тела, создавая необходимые условия для поддержания биохимического и иммунологического благополучия человека, что в свою очередь играет ключевую роль в защите от различных недугов и препятствует оседанию нежелательных микроорганизмов. Здоровье человека в значительной степени зависит от способности его микрофлоры справляться с поставленными задачами.

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) представляет собой весьма сложную микроэкологическую систему в теле человека с обширной слизистой оболочкой около 400 квадратных метров, где обитает более тысячи различных видов микробов, включая бактерии, вирусы, грибы, и археи, создавая высокую плотность заселения. Это сложное партнерство между микрофлорой и защитными механизмами организма обеспечивает тонкий баланс, необходимый для его здоровья и надлежащего функционирования.

Бактериальное население в человеческом желудочно-кишечном тракте является исключительно разнообразным, однако их идентификация большей частью возможна только с помощью молекулярно-генетических методов. В объеме содержимого толстой кишки человека бактерии занимают примерно от 35% до 50%, с общей биомассой около 1,5 кг в ЖКТ. Распределение этих микроорганизмов по ЖКТ неодинаково; в то время как в желудке их плотность довольно низкая, порядка  $10^3$ – $10^4$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на миллилитр, а в подвздошной кишке она возрастает до  $10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл. Максимальная плотность бактериальной колонизации наблюдается в области ободочной кишки у

илеоцекального клапана, где показатель достигает от 10<sup>11</sup> до 10<sup>12</sup> КОЕ/мл [5].

В любой экосистеме микроорганизмов, включая экосистему кишечника, преобладает основная группа постоянных обитателей, составляющих 90%, которые играют ключевую роль в налаживании симбиотических связей между более крупными организмами и их микробным населением. Они также важны для управления взаимоотношениями внутри микробного сообщества. Помимо них, есть дополнительные микроорганизмы, которые составляют примерно 10% и выполняют вспомогательную функцию, а также случайно попадающие и временно присутствующие виды, занимающие лишь 0,01%, что дополняет разнообразие микробной экосистемы.

Вдоль пути от желудка к кишке, наблюдается рост численности и биологической разнообразности микробов следуя от головной к нижней части. Кроме того, состав микроорганизмов варьируется между внутренним пространством кишечника и его слизистой оболочкой. Внутри кишечного пространства преобладают *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* и *Ruminococcus*, тогда как на слизистой оболочке доминируют *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Akkermansia*. Это указывает на то, что микробный ландшафт в кишечнике изменяется не только в зависимости от его расположения, но и от того, находится ли он в контакте с внутренней пустотой или непосредственно с слизистой оболочкой.

Микробы, находящиеся в просвете кишечника и прилегающих к его стенкам (также известные как просветная и мукозальная микробиота), играют ключевую роль в поддержании баланса организма и здоровья кишечника [3]. Эти организмы, располагающиеся в непосредственной близости к слизистой оболочке кишечника, эпителиальным клеткам и основным элементам иммунной системы этой области, имеют двойственное воздействие: они могут способствовать поддержанию

нормального функционирования клеток хозяина и баланса микрофлоры, так и инициировать процессы, приводящие к развитию воспалений.

Состояние микрофлоры кишечника взрослого человека, как правило, сохраняется неизменным на протяжении его жизни, после того как она сформировалась. Исследования показывают, что существует некоторое отличие в составе микрофлоры между пожилыми и молодыми людьми: у первых обычно присутствуют в большем количестве бактерии родов *Bacteroides* и *Clostridium*, а у вторых - *Firmicutes*. Описано три главных типа микробиоты кишечника, которые были идентифицированы как независимые от веса, возраста, пола человека или его этнической принадлежности и разделены на энтеротипы в зависимости от господствующего рода бактерий: первый энтеротип обусловлен преобладанием *Bacteroides*, второй - *Prevotella*, и третий - *Ruminococcus*.

В человеческой толстой кишке обитает множество микроорганизмов, включая разнообразные бактерии и простейшие, как-то: *Actinomyces*, *Citrobacter*, *Corynebacterium* и другие, а также анаэробы типа *Gemiger* и *Metanobrevibacter*, непатогенные простейшие из родов *Chilomastix* и *Entamoeba*, не говоря уже о более чем десятке типов кишечных вирусов. В список бактериальных обитателей также входят *Peptococcus*, *Veillonella*, *Acidominococcus*, среди прочих, демонстрируя впечатляющее разнообразие микробного ландшафта в этой части пищеварительной системы [2].

Комплексное взаимодействие микроорганизмов с кишечной стенкой создает уникальную структуру, объединяющую в себе бактериальные микроколонии, их метаболические продукты, муцин, эпителиальные клетки и их гликокаликс, а также различные клетки поддерживающей ткани, включая фибробласты и иммунные клетки. Этот микробно-тканевой комплекс играет ключевую роль в поддержании здоровья кишечника. Важно также учитывать динамично меняющуюся популяцию микрофлоры в просвете кишечника, которая напрямую зависит от поступления и характера пищи, особенно от содержания в ней пищевых волокон. Эти

волокна служат не только питанием для бактерий, но и основой, помогающей им закрепляться и формировать колонии, что демонстрирует глубину взаимосвязей внутри кишечного микробиома.

В структуре кишечной микрофлоры выделяются как обязательные (бифидобактерии, к примеру, являются ключевыми в нормальной флоре, поддерживая метаболизм и обеспечивая защиту от инфекций), так и необязательные микроорганизмы, которые хотя и присутствуют у здоровых индивидов, могут становиться источником заболеваний при ослаблении иммунитета. В составе фекальной микрофлоры первенство занимает полостная флора, отражая баланс между разными группами микроорганизмов в пищеварительном тракте.

Защитная роль кишечной флоры заключается в ингибировании роста вредных бактерий, благодаря чему предупреждаются возможные инфекционные заболевания. Иммунная система кишечника, выполняющая первостепенную задачу защиты от вторжения бактерий в кровоток, также нацелена на нейтрализацию вредоносных микробов [5]. Её эффективность достигается за счет двойного действия: инстинктивного иммунитета, который передается от матери к ребенку и обеспечивает наличие антител в крови с момента рождения, и адаптивного иммунитета, развивающегося в ответ на встречу с чужеродными агентами, например, после борьбы с инфекцией.

Интересно отметить, что флора кишечника не только борется с вредными микроорганизмами, выделяя антимикробные компоненты, но и пострадает при дисбиозе, когда усиливается активность патогенных бактерий и падает иммунитет. В первые года жизни, естественная микробная среда кишечника особенно критична для здорового развития ребенка и его защитных сил.

Микробная популяция играет ключевую роль в поддержании функций кишечника, включая переработку пищевых ферментов, а также в абсорбции и иммунитете. Она также активно участвует в поддержании

здоровья клеток кишечной стенки и регулирует его перистальтику и секрецию. Хотя в желудке насчитывается меньше микроорганизмов, их концентрация резко возрастает в тонком кишечнике и достигает максимума в толстом кишечнике [4]. Эта микрофлора не только эффективно справляется с расщеплением биоактивных элементов, но и выполняет защитную функцию, предотвращая размножение патогенных микробов и защищая организм от инфекций благодаря механизму колонизационной резистентности.

Важность кишечной микрофлоры для человеческого организма трудно переоценить. Она играет ключевую роль в процессах пищеварения, включая распад жирных и желчных кислот, белков, углеводов и холестерина, а также влияет на устранение веществ, потенциально способных спровоцировать рак, и избытков пищи, способствуя формированию каловых масс. Особенно заметно ее действие в разложении клетчатки, которая не усваивается в тонком кишечнике, благодаря ферментам, производимым бактериями. Синтез витаминов, таких как витамин К и группы В, незаменимых аминокислот и ферментов, необходимых организму, также происходит с ее участием. Нарушение баланса этой нормофлоры, или дисбактериоз, может привести к глубоким нарушениям здоровья, включая метаболические и иммунологические заболевания, подчеркивая ее критическую значимость для хозяина.

Микроорганизмы, населяющие желудочно-кишечный тракт, имеют важное значение для поддержания здоровья организма человека, выполняющие такие функции как иммунную, пищеварительную и защитную. При перемене состава микробиоты и сокращении разнообразия видов возрастает вероятность возникновения заболеваний [5]. Употребление антибиотиков при лечении снижает общее количество бактерий, чувствительных к примененному антибиотику и эффект терапии обусловлен тем, придет ли в норму численность микробиоты, восстановится ли благоприятный баланс в кишечнике.

В толстом кишечнике находится примерно 70% микроорганизмов, которые населяют человеческий организм. Среди всей разнообразной микробиоты можно выделить семь типов: бактериоиды, фирмикуты, актинобактерии, цианобактерии, протеобактерии, фузобактерии, веррукобактерии. В кишечнике ко вторым группам относятся 80-90% бактерий: Бактероиды и Фирмикуты. Микробиота ЖКТ в зависимости от типа потребляемого субстрата (углеводы и белки) и продуцируемых ферментов делится на сахаролитическую и протеолитическую [8]. Сахаролитические бактерии в сочетании с неперевариваемой клетчаткой образуют энтеросорбент с высокой поглощающей способностью.

Микробиота для организма человека вырабатывает нужные метаболиты, ограждает от прохождения патогенных микробов, способствует формированию иммунитета, а человек снабжает питательными веществами для комфортных условий для ее работы. Микроорганизмы в кишечнике в процессе своей жизнедеятельности выделяют тепло, в результате обработки грубой клетчатки. В следствии работы микробиоты происходит синтез витаминов группы В и К.

Микроорганизмы, которые населяют кишечник, могут выполнить недостающие функции [12]. Микробиота участвует в распаде клетчатки, растительных полисахаридов и короткоцепочечных жирных кислот (ацетат, бутират, пропионат). Синтезирует аминокислоты (треонин, лизин) и способствует деградации аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин).

По составу преобладающих родов бактерий людей выделяют три энтеротипа. Они определяются по содержанию доминирующих одного из трех бактериальных родов: энтеротип 1- *Bacteroidetes*, энтеротип 2- *Prevotella*, Энтеротип 3- *Ruminococcus* [5].

В плазме почти все короткоцепочечные жирные кислоты являются метаболизмом бактерий. Больше десяти процентов энергопотребности осуществляют короткоцепочечные жирные кислоты. Значимую роль

короткоцепочечные жирные кислоты обеспечивают в сохранении метаболического здоровья и оптимальной работы кишечника человека. Они способствуют повышению ощущения сытости и уменьшению потребления калорий. Вследствие микробной ферментации не перевариваемых углеводов вырабатывается ацетат, бутират и пропионат. Они участвуют в выработке слизи, обеспечивают целостность слизистой кишечника, выполняют иммунную функцию слизистой оболочки и снабжают энергией эпителиальные клетки [5].

Бактерии, обладающие в ЖКТ человека это филумы *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*. Основным составом микробиоты являются представители филума *Lentisphaerae*, *Planctomycetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, *Deinococcus-Thermus*.

Давайте подробнее рассмотрим отдельных членов определенного филума. К числу *Bacteroidetes* относятся бактерии, населяющие человеческий желудочно-кишечный тракт, принадлежащие к семействам *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Porphyromonadaceae* и *Rikenellaceae*. Интересен факт о выделении бактерий типа *Bacteroides fragilis*, что случилось в 1898 году при исследовании пациентов с аппендицитом, эти бактерии тогда были признаны патогенами. Филум *Bacteroidetes*, будучи одним из наиболее обширных, отличается высокой динамичностью в изменении своего таксономического состава внутри кишечной микрофлоры, который может сильно варьироваться вследствие различий в диете, месте проживания и образе жизни человека [3].

Микробы из группы *Bacteroidetes*, населяющие конечные участки кишечника, играют ключевую роль в энергетическом метаболизме своих хозяев. Они обеспечивают разложение волокон, неподдающихся усвоению, что приводит к образованию короткоцепочечных жирных кислот. Эти кислоты в состоянии покрыть до 10% энергетических потребностей человека за счет адекватного потребления клетчатки каждый

день. Однако, переориентация на здоровое питание, богатое волокнами, не оставляет без последствий бактериальное разнообразие в этой группе, сокращая его, несмотря на первичную задачу *Bacteroidetes* по переработке пищевых волокон.

Представляется вероятным, что лишь ограниченное количество бактерий внутри обширной группы *Bacteroidetes* занимается расщеплением сложных углеводных соединений. Эта конкретная подгруппа видит значительное увеличение в своей численности при употреблении сбалансированных питательных веществ, в то время как другие виды в этом же филуме могут сокращаться в числе или даже полностью исчезать [1]. Согласно наблюдениям, уже с самых первых дней жизни у новорождённых начинает формироваться среда в желудочно-кишечном тракте, благоприятствующая процветанию *Bacteroidetes* благодаря наличию непереваримых олигосахаридов в материнском молоке. Именно из-за их способности разлагать полисахариды большое внимание уделяется изучению бактерий филума *Bacteroidetes* в контексте борьбы с ожирением и изучения связанных с ним заболеваний, ведь основная масса данных микроорганизмов адаптирована к обработке такого рода веществ.

В кишечной микрофлоре населяют различные виды бактерий, в число которых входят представители семейства *Bacteroidetes*, такие как *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, а также, хоть и в меньших количествах, *Alistipes* и *Parabacteroides*. В этой группе *Bacteroides* выделяются своей способностью адаптироваться к разнообразным питательным субстратам. Они демонстрируют умение манипулировать своей генетической экспрессией для перехода между различными метаболическими маршрутами. Например, в условиях дефицита углеводов, поступающих с пищей, *Bacteroides thetaiotaomicron* способен изменять свой механизм обработки полисахаридов на использование гликанов, которые вырабатываются мукоцитами человека.

В микробиоме человеческого желудочно-кишечного тракта особое место занимают бактерии из типа *Firmicutes*, формируя большинство его состава - иногда они могут составлять до 80% всей микрофлоры у здорового взрослого. Иронично, что эти микробы, ценящиеся за свое многообразие, выполняют множество разнообразных функций в ЖКТ, среди которых выделяются такие полезные свойства, как пробиотические эффекты вида *Lactobacillus spp* [5]. Именно благодаря их разносторонности и количественному преобладанию большая часть современных методик культивации бактерий была разработана и апробирована именно на примере представителей этого типа, что подчеркивает их значимость для науки и здоровья человека.

В человеческом желудочно-кишечном тракте обитает множество разнообразных бактерий, в том числе представители филума *Firmicutes*, который разделяется на четыре основных класса: *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichi*, и *Negativicutes*. В числе этих классов, особенностью выделяется *Clostridia*, включающий в себя семейства *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*, которые присутствуют в самом большом количестве. Кроме того, достаточно обширна также группа *Bacilli*, населяющая верхние части ЖКТ и включающая бактерии родов как *Lactobacillus*, так и *Enterococcus*, а также *Streptococcus*. Среди этих микроорганизмов встречаются и такие, которые обладают патогенными свойствами, включая *Clostridium difficile*.

Активные научные работы фокусируются на изучении семейства *Lactobacillaceae*, относящегося к классу *Bacilli*. В результате анализа популяций микробов методами культурального выращивания было обнаружено, что в области тонкой кишки доминирует группа *Lactobacillus spp.*, в то время как их присутствие в составе фекальной микрофлоры намного меньше, не превышая 10<sup>8</sup> клеток на грамм [15]. Молекулярные методы анализа также выявили наличие данных бактерий в верхних частях

желудочно-кишечного тракта, где их количество существенно меньше по сравнению с такими родами, как *Streptococcus* и *Veillonella spp.*

Применение этих бактерий как пробиотических агентов, преимущественно *L*

Во множестве клинических исследований было выявлено, что использование бактерий таких как *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, и *L. delbrueckii* может оказывать благоприятное воздействие на лечение различных заболеваний [6]. К ним относятся инфекционная диарея, язвенный колит, болезнь Крона, некротический энтероколит, воспалительные болезни кишечника, среди прочих. Исследования дополнительно подчеркивают важность бактерий рода *Lactobacillus spp.* в поддержании здорового функционирования кишечника. Особенно это касается их роли в предотвращении хронических запоров, указывая на связь между снижением количества этих бактерий и ухудшением двигательной функции кишечника.

Внутри класса *Bacilli*, в порядке *Lactobacillales*, не только семейство *Lactobacillaceae* имеет значение, но и близкое к нему семейство *Leuconostocaceae* играет роль. В частности, в мукозальном слое человеческого кишечника можно найти бактерии двух родов, принадлежащих к последнему упомянутому семейству - это *Leuconostoc* и *Weissella*. Они составляют до 24% от общего числа микроорганизмов, населяющих желудочно-кишечный тракт [18]. С другой стороны, национальное преобладание в верхнем отделе тонкого кишечника отводится бактериям из других семейств порядка *Lactobacillales* - *Streptococcaceae* и *Enterococcaceae*.

Бактерии из семейства, которое раньше включало в себя *Gemella*, относят к классу *Bacilli* и являются частой частью микрофлоры в верхних участках желудочно-кишечного тракта, в частности, в начальной части тонкого кишечника. Хотя точные функции этих бактерий в организме

здорового человека остаются неизвестными, известно, что некоторые их виды могут вызывать заболевания и распространяться на другие органы, особенно в случаях проблем с желудочно-кишечным трактом [1]. Количество бактерий из группы *Bacillales* присутствует в желудочно-кишечном тракте человека в относительно малых количествах, составляя от 100 до 10 тысяч клеток на миллилитр кишечного содержимого.

В нижней части желудочно-кишечного тракта человека главенствуют микроорганизмы класса *Clostridia*, принадлежащие к типу *Firmicutes*. Эта зона обогащена представителями различных семейств, включая *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Christensenellaceae*, *Eubacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, и *Ruminococcaceae*. Отдельно стоит филум *Actinobacteria*, который включает в себя одноименный класс *Actinobacteria*, играющий важную роль в микробном сообществе ЖКТ человека [1]. В рамках этой группы особо выделяются порядки *Bifidobacteriales*, где ключевую роль играют бифидобактерии (*Bifidobacterium spp.*), и *Coriobacteriales*, среди которых выделяются представители рода *Collinsella*.

С момента рождения, микрофлора желудочно-кишечного тракта у детей обогащена *Bifidobacterium spp.*, что делает их основными обитателями [2]. В то же время, бактерии группы *Actinobacteriales* встречаются гораздо реже и лишь в минимальных количествах. Преобладание *Bifidobacterium spp.* в детской микрофлоре ЖКТ во многом объясняется питанием материнским молоком. В его составе присутствуют специфические олигосахариды, не поддающиеся перевариванию. Они служат питательной средой для *Bifidobacterium spp.*, что способствует их росту и размножению, обеспечивая таким образом доминирование данных бактерий в микробиоте младенцев.

До момента, когда ребенок перестает получать материнское молоко, микрофлора его желудочно-кишечного тракта включает в себя. Среди этого микробного сообщества Бифидобактерии являются особенно

постоянным элементом, чье присутствие не подвергается значительным изменениям в течение всей жизни человека. В филогенетическом отношении, они образуют единую группу, демонстрируя стабильность в составе микробиоты желудочно-кишечного тракта.

В человеческом кишечнике бактерии порядка *Actinomycetales*, которые принадлежат к классу *Actinobacteria*, не особенно многочисленны, причем их количество в отобранных пробах кала редко превышает 100-1000 клеток на грамм. В этой среде особо часто встречаются представители групп *Propionibacterium spp.* и *Corynebacterium spp.*, хотя для них привычнее обитание на кожных покровах человека. К примеру, *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii*, находя его применение в производстве молочных продуктов благодаря своим ферментативным свойствам, также активно используется как составная часть сложных пробиотиков вместе с Лакто- и Бифидобактериями. Эти пробиотики направлены на борьбу с такими расстройствами, как синдром раздраженного кишечника [3].

Бактерии из семейства *Actinomycetes*, которые причисляют к порядку *Actinomycetales*, играют значимую и многообразную роль в желудочно-кишечном тракте человека. Эти микроорганизмы отличаются обширным биосинтетическим потенциалом, что позволяет им производить разнообразные субстраты, включая формиат, ацетат, сукцинат, лактат и многочисленные антимикробные вещества. Важнейшая функция *Actinomycetes* в ЖКТ человека связана с разложением и последующей рециркуляцией органических веществ. Кроме этого, *Actinomycetes* могут принимать участие в развитии актиномикоза – заболевания, способного поражать различные органы, в том числе элементы ЖКТ, выступая в качестве патобионтов.

В недавно определенной категории бактерий под названием *Tenericutes*, класс *Mollicutes* занимает важное место. На текущий момент большая их часть, населяющая человеческий пищеварительный тракт, так

и остаётся некультивированной, несмотря на то, что эти организмы часто встречаются в результате исследований на генетическом уровне. В ходе последних исследований стало известно о важной роли, которую играют эти микроорганизмы, свидетельствуя о сильной связи между их присутствием и повышением уровня триметиламин N-оксида [5]. Этот метаболит является фактором, способствующим развитию атеросклероза.

*Fusobacteria* представляет собой ещё одну категорию бактерий, широко распространенных в желудочно-кишечном тракте, с доминирующим внутри неё родом *Fusobacterium*.

Обычно считают, что определённые бактерии приводят к кишечным воспалениям, однако вид *Fusobacterium spp.* встречается даже среди здорового населения, причём их количество может достигать 10 миллиардов клеток на грамм каловых масс. Интересно, что *Fusobacterium necrophorum*, ранее известный как *Bacillus fusiforme*, был впервые идентифицирован как возбудитель аппендицита, подчёркивая его патогенные свойства.

Протеобактерии, относящиеся к филуму *Proteobacteria*, представляют собой типичный элемент микробного сообщества человеческого желудочно-кишечного тракта [5]. Несмотря на своё разнообразие, их доля в общем количестве микробиоты в организме здорового человека не превышает 1%, что свидетельствует об их небольшом количестве. В состав этой большой группы бактерий входят пять классов, которые получили обозначения: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-* и *Epsilonproteobacteria*. Интересно, что про *Alphaproteobacteria* научному сообществу известно крайне мало. В доступных источниках отсутствует информация о том, какие специфические роли они играют в ЖКТ человека или как связано их количество с различными заболеваниями. А вот среди представителей класса *Betaproteobacteria* чаще всего встречаются виды, названные *Sutterella* и *Parrasutterella*.

В кишечнике, а именно в подвздошной его части, обитают бактерии *Alcaligenes faecalis* и их ближайшие "родственники". Изучение их роли и функций, как представителей группы *Betaproteobacteria*, пока что находится на начальном этапе. В контексте взаимодействия с оксалатом, бактерия *Oxalobacter formigenes* играет ключевую роль, поскольку имеет уникальную способность его перерабатывать [7]. Эта особенность оказывает существенное влияние на уровень оксалата в выделениях организма, включая фекалии и мочу, что, в свою очередь, предотвращает формирование камней в почках. С другой стороны, бактерии рода *Neisseria* населяют мукозные оболочки респираторного тракта, ЖКТ, а также половые пути. Особенно пристальное внимание ученых привлекают *Neisseria gonorrhoea* и *Neisseria meningitidis*, поскольку они являются возбудителями таких серьезных заболеваний, как гонорея и менингит.

Известно, что большинство видов *Neisseria spp.* не вызывают болезни. Хотя их присутствие в микрофлоре желудочно-кишечного тракта было подмечено достаточно давно в культурных исследованиях, полный спектр их функций остаётся неизученным. В состав класса *Betaproteobacteria* входят и другие бактериальные виды из различных родов, которые встречаются в ЖКТ человека реже, но также считаются частью его микробного сообщества. Например, *Acidovorax spp.* обнаруживают в слизи кишечника, а *Variovorax spp.* присутствуют в верхней части ЖК-тракта, в то время как виды *Burkholderia spp.* также играют свою роль в составе этого богатого микробного многообразия.

В контексте исследований желудочно-кишечного тракта человека, класс *Gamma proteobacteria*, который насчитывает шесть порядков и восемьдесят девять семейств, играет важную роль. Среди этих семейств несомненно выделяется *Enterobacteriaceae* за его видовое многообразие и численность представителей. Эта группа нашла широкое применение в генетических и клинических исследованиях, что способствовало подробному описанию её членов в научной литературе. Особое место

среди них занимает *Escherichia coli* - первый идентифицированный представитель класса *Gammaproteobacteria*, который не только выделяется своим преобладанием среди прочих бактерий данного семейства в ЖКТ, но и часто оказывается самым многочисленным факультативным анаэробом в образцах, взятых для анализа [10]. В дополнение, стоит отметить, что при печёночной энцефалопатии наблюдается повышенное присутствие некоторых микроорганизмов, что может свидетельствовать о важности точного понимания микробной флоры ЖКТ в контексте этого состояния.

Варианты свойств, проявляемые штаммами *E. coli*, охватывают широкий спектр - от полезных пробиотических до вредоносных патогенных, способных вызвать диарею и инфекционные заболевания в разных частях тела. В то время как многие бактерии из семейства *Enterobacteriaceae* часто ассоциируются с диареей, не каждое их присутствие в микрофлоре кишечника неизбежно влечет за собой развитие патологических процессов. Примечательно, что с возрастом популяция этих бактерий в кишечнике может увеличиваться, но даже среди пожилых людей их доля не превышает 1% от общего количества микроорганизмов, составляющих микробиому желудочно-кишечного тракта.

В микробиоме желудочно-кишечного тракта человека редко встречаются другие виды семейства *Enterobacteriaceae*.

В микробиоме человеческого желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) обнаружен уникальный представитель филума *Lentisphaerae*, известный как *Victivallis vadensis*, который выделяется как анаэробная бактерия. Основная функция этой бактерии заключается в разложении моно- и дисахаридов, получаемых из пищи, с целлобиозой как предпочтительным источником энергии. На данный момент, это единственный известный представитель своего филума, обнаруженный в ЖКТ человека.

С другой стороны, существует филум *Spirochetes*, содержащий бактерии, которые долгое время ассоциировались с патогенностью в

ветеринарной медицине [3]. Вопрос об их патогенном влиянии на человека остается открытым. Из этих спирохет в ЖКТ человека выделены и культивированы только два вида: *Brachyspira pilosicoli* и *Brachyspira aalborgi*. Их присутствие может не иметь никаких последствий или, напротив, вызывать такие симптомы, как абдоминальные боли, диарею и воспалительные заболевания кишечника, что показывает разнообразие влияния этих бактерий на организм человека.

*Synergistetes* представляют собой филум, который был идентифицирован относительно недавно. Эти бактерии составляют лишь примерно 0.01% от всего микробного населения в человеческом желудочно-кишечном тракте [4]. Хотя исследования их характеристик еще не достигли широкого охвата, имеются научные данные, указывающие на то, что в тканях слизистой оболочки, забранных у пациентов с колоректальным раком, концентрация *Synergistetes* может быть повышенной. Кроме того, было зафиксировано увеличение количества этих бактерий в каловых массах крыс, которые участвовали в исследовании на модели острого инфаркта миокарда.

К настоящему моменту, в категории *Verrucomicrobia* ученые выделили всего одну бактерию, проживающую в человеческом пищеварительном тракте. Открытая в 2004 году, бактерия *Akkermansia muciniphila* демонстрирует уникальную способность к размножению при использовании муцина в качестве основного питательного источника. Наличие этой бактерии было зафиксировано в стуле людей различных возрастных категорий, указывая на то, что ее присутствие может быть константой для нормальной микрофлоры человека, несмотря на колебания ее концентрации у разных людей.

В кишечнике человека также обитают археи, несмотря на то что они представляют лишь малую часть микробного населения. Среди архей в исследованиях часто выявляют наличие видов из рода *Methanobrevibacter sp.*, вносящих значительный вклад в производство метана в кишечнике [3].

Помимо этого, обнаружены и другие виды архей, включая *Methanosphaera*, *Nitrososphaera*, *Thermogynomonas*, *Thermoplasma*, и *Methanomethylophilus alvus*. Если говорить о вирусах в контексте кишечной микробиоты, то знания об их роли ограничены и в основном касаются связи с различными болезнями и патологиями, в то время как мало что известно о влиянии вирусов, не вызывающих заболеваний, на здоровье кишечника.

Организмы, известные как грибы, занимают свою уникальную категорию в системе классификации живых существ, принадлежа к царству внутри домена эукариот. В составе микробиоты кишечника они представлены лишь небольшой долей - около 0.03% от общего числа микроорганизмов [2].

Разнообразие бактерий в специфических сегментах кишечника сильно зависит от широкого спектра факторов, включая рацион питания, образ жизни, воздействие вирусов и бактерий, а также использование лекарственных средств, прежде всего антибиотиков. Воспаления и другие расстройства пищеварительной системы могут сбивать с равновесия микробный ландшафт кишечника. Дисбаланс в этой среде зачастую приводит к распространенным желудочно-кишечным нарушениям, таким как диспепсия, запоры, диарея, вздутие живота и прочим проблемам с пищеварением.

## 1.2. Пробиотики

Живые микроорганизмы, известные как пробиотики, применяются в разнообразных продуктах питания, пищевых добавках и лекарствах. Лактобактерии и бифидобактерии занимают ведущее место среди пробиотических культур, предоставляя огромную пользу для функционирования желудочно-кишечного тракта. Система питания человека значительно влияет на состав бифидофлоры, которая насчитывает более 30 различных видов и является ключевым элементом микрофлоры в кишечнике.

Уменьшение или полное исчезновение таких микроорганизмов, как *B.breve*, *B.adolescentis*, *B.infantis*, *B.longum*, и *bifidum* в пищеварительной системе может спровоцировать серьезные сбои в пищеварительных процессах и нарушение обменных функций организма. Отсутствие должного количества бифидобактерий способствует активизации вредоносных микроорганизмов, в том числе стафилококков, протеев и грибов *Candida*, которые становятся особенно опасными. Бифидобактерии полезны для здоровья как детей, так и взрослых благодаря их способности вырабатывать молочную и уксусную кислоты. Эти кислоты обеспечивают кислую среду в кишечнике, что помогает предотвратить развитие патогенных, гнилостных и газообразующих микроорганизмов.

Бифидобактерии выполняют важную функцию в организме, выпуская вещества, известные как бактериоцины — бифидин и бифилонг, блокирующие развитие разнообразных патогенных микроорганизмов, включая энтеробактерии, вибрионы, стрептококки и стафилококки [8]. Кроме того, эти микроорганизмы обогащают организм витаминами и важнейшими аминокислотами, например, триптофаном, и демонстрируют свойства, препятствующие развитию раковых заболеваний и мутаций, а также способны уменьшать концентрацию холестерина в крови. Благодаря выработке специфических кислот, бифидобактерии обеспечивают защиту гастроинтестинального тракта от инвазии вредоносных микроорганизмов, внося весомый вклад в общую устойчивость организма к внешним угрозам.

Бифидобактерии демонстрируют защитные свойства благодаря своей способности сильно прилипать к слизистой оболочке толстой кишки. Важно подчеркнуть, что штаммы *B. infantis* и *B.adolescentis* способствуют уменьшению в кишечнике уровня метаболитов, таких как нитриты, нитрозамины, крезол, индол и аммиак, которые могут вызывать рак, и они также способны улучшать обмен стероидных гормонов. Благодаря этим бактериям повышается иммунный ответ, в частности за счет увеличения

производства иммуноглобулина А и защиты от распада секреторного IgА в кишечнике. Они также стимулируют фагоцитоз, восстанавливают баланс между CD4 и CD8 клетками, усиливают выработку интерлейкинов (IL-6 и IL-1b) и также увеличивают производство гамма-интерферона.

Бактерии рода Лактобацилл, известные своей грам-положительной палочковидной формой, не образуют спор и могут существовать как в условиях доступа кислорода, так и без него. Их классификация включает в себя разделение на гомоферментативные и гетероферментативные типы, основываясь на их способности производить углекислоту из глюкозы, потреблении тиамин, способности ферментировать фруктозу в маннит и наличии фермента фруктозодифосфаталядолазы. С точки зрения филогенетики, лактобациллы сгруппированы в три основных категории: *L.delbrueckii*, *L.casei-Pediococcus* и *Leuconostos*, при этом род *Lactobacillus* включает в себя 56 видов, разделённых на 11 родов. Лактобациллы могут быть найдены вдоль всего желудочно-кишечного тракта и составляют ключевую часть микрофлоры половых путей.

Лактобактерии, производя органические кислоты, перекиси, антибиотики, и бактериоцины в результате своей жизнедеятельности, играют ключевую роль в подавлении роста вредоносных микроорганизмов, благодаря чему оказывают сильное антибактериальное воздействие [7]. Эти микроорганизмы специально приспособлены к прикреплению к слизистым оболочкам, формируя на их поверхности барьер, который служит защитой от различных заболеваний, в том числе тех, что атакуют пищеварительный и мочеполовой тракты. Кроме того, открыто, что благодаря своей уникальной оксалатмодифицирующей способности, определённые штаммы лактобактерий могут снижать вероятность образования камней в почках, что является ещё одним проявлением их полезного влияния на здоровье человека.

Исследования указывают на уникальные свойства лактобацилл, особенно *lactobacillus GG*, которые могут эффективно бороться с

обострениями язвенного колита, спровоцированными *C.Difficile*, и значительно улучшать состояние при диарее у младенцев, а также других заболеваниях. Лактобациллы особенно ценятся за их способность воздействовать на иммунную систему, это достигается благодаря способности *L.acidophilus* стимулировать переход моноцитов в активное состояние и усиливать способность фагоцитов к уничтожению патогенов. Важнейшей особенностью лактобацилл, играющей ключевую роль в их иммуностимулирующем действии, является наличие в их составе пептидогликанов, тейхоевых кислот, а также способность производить аргинин и окись азота, что в совокупности помогает предотвратить прикрепление чужеродных микроорганизмов и формирование ими эндотоксинов [4].

В современном мире, *Lactobacillus acidophilus*, является ключевым элементом в создании широкого спектра терапевтических и диетических продуктов на основе кислого молока [8]. Этот ингредиент можно встретить в биологически активных добавках и в составе кисломолочных продуктов, как в одиночестве, так и в сочетании с разнообразными типами бифидобактерий, расширяя возможности для улучшения состояния здоровья путем питания.

В наше время под словом "пробиотики" понимают, как правило, БАДы или медикаменты, в состав которых входят определенные штаммы микроорганизмов, естественно обитающих в организме человека, или их метаболитические продукты, оказывающие благоприятное воздействие на здоровье. А также известны такие понятия, как "пребиотики" и "симбиотики", которые также широко используются в данном контексте. Особенным классом являются пребиотики, которые, не будучи микробными агентами, способствуют улучшению состояния здоровья за счет стимулирования роста и метаболической активности бенефициальной кишечной микрофлоры при помощи селективного действия. Примером

пребиотиков служат олигосахариды, такие как фруктоолигосахариды, которые активизируют развитие бифидобактерий [13].

Живущие микроорганизмы, известные как пробиотики, при употреблении в надлежащих количествах с пищей способны улучшать здоровье, воздействуя на желудочно-кишечный тракт. В то же время, симбиотики представляют уникальное объединение пре- и пробиотиков, которые вместе вносят свой вклад в поддержание хорошего состояния здоровья.

### 1.3. Дисбактериоз

Изменение в нормальной микробной экосистеме, известное как дисбактериоз (термин происходит из греческого языка, где "*dys*" означает "нарушение", а "*bacteria*" – бактерии), отражается на состоянии баланса между микроорганизмами и человеческим или животным организмом. Это состояние характеризуется неправильным количественным и качественным соотношением бактериального населения, что влечет за собой нарушения в работе системы «окружающая среда – живой организм – микрофлора» [5]. Такое недополучение баланса может способствовать зарождению и ухудшению болезней, а в крайних случаях привести к смертельным исходам. Порой предпочитают использовать термин дисбиоз, который подразумевает любые нарушения во взаимодействии между организмом-хозяином и его микробиотой, в том числе вирусы, грибы, паразиты и прочие микроорганизмы.

В рамках упомянутого понятия встречаются многочисленные и широко известные болезни, среди которых встречаются гепатиты, вызванные вирусами, заболевания, обусловленные рота- и энтеровирусами, а также такие инфекции, как грипп и ОРВИ. Кроме того, сюда же относятся проблемы, связанные с туберкулезом, различными

грибковыми заболеваниями (микозы), а также паразитарными инфекциями, включая лямблиоз, описторхоз, гельминтозы и прочие.

Концепция "кишечного дисбактериоза" охватывает несколько ключевых аспектов [12]:

- Во-первых, это относится к разнообразию и объему встречающихся микроорганизмов в различных участках кишечника, таких как тонкий и толстый отделы.

- Во-вторых, картина дополняется появлением определенных видов микробов, которые обычно не являются частью естественной микрофлоры, включая различные виды, такие как *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Hafnia*, и даже особые формы *E.coli*, обладающие гемолизирующими способностями и другие типы, включая *Pseudomonas*.

Характеризуя дисбактериоз кишечника, следует подчеркнуть, что он не считается изолированным заболеванием. Тем не менее, он связан с множеством симптомов и синдромов, оказывающих значительное влияние на общее состояние здоровья, вызывая патологические нарушения в функционировании пищеварительной системы и сопутствующих органов.

Сегодня обычно определяют четыре уровня дисбаланса микрофлоры кишечника, причем первый уровень, иначе известный как скрытая или компенсированная фаза, характеризуется легкими колебаниями в количестве аэробных микроорганизмов, включая увеличение или уменьшение эшерихий, при этом состав бифидо- и лактофлоры остается без изменений [17]. Дискомфорт в кишечнике, если он и появляется, то проходит быстро и не вызывает серьезных последствий. Несмотря на то, что это скрытая фаза обычно не приводит к заметным нарушениям в работе кишечника, она может представлять опасность для пожилых людей или тех, кто уже страдает от других заболеваний, повышая риск самозаражения.

Во второй фазе дисбактериоза, известной как субкомпенсированный этап, происходят не только количественные, но и качественные сдвиги в

микрофлоре. В этой стадии уменьшается число бифидобактерий, в то же время растет присутствие условно-патогенных микроорганизмов, в том числе псевдомонад и грибов, а также изменяется баланс эшерихий. Обычно эти нарушения затрагивают определённые участки кишечника и вызывают местное воспаление [13]. Несмотря на это, если у человека нет сопутствующих факторов риска, таких как другие заболевания, стресс или возрастные изменения, его защитные механизмы достаточно эффективно препятствуют прогрессированию данного состояния благодаря надежным барьерным функциям.

На третьей стадии процесса наблюдается осязаемое уменьшение количества бифидо- и лактобактерий, при этом количество эшерихий меняется в сторону увеличения, что создает благоприятные условия для размножения флоры, способной вызвать заболевания [11]. В результате усугубляются клинические проявления, происходят сбои в работе кишечника и возрастает общий дисбаланс системы.

Переход к четвертой стадии характеризуется драматическим уменьшением, а порой и полным исчезновением бифидобактерий, сокращением численности лактобактерий и серьезными изменениями в составе и деятельности эшерихий. Это сопровождается разрастанием вредоносных микроорганизмов, что может приводить к нарушениям в функционировании разных частей желудочно-кишечного тракта. Такие нарушения могут стать причиной разрушения стенок кишечника и, как следствие, повышают риск развития бактериемии и сепсиса.

В некоторых случаях, обнаружение микроорганизмов происходит в органах и биологических материалах, обычно считающихся стерильными, как например в крови или моче, что приводит к формированию новых инфекционных вспышек.

#### 1.4. Условно патогенные и патогенные бактерии ЖКТ

Во избежание проникновения обычных кишечных бактерий внутрь тела, существует эффективная защита благодаря функционированию слизистых барьеров в системе пищеварения. Защитный механизм желудочно-кишечного тракта состоит из трех слоев: защита перед клеточным слоем, сам клеточный слой и защита за ним. В рамках первого слоя основу защиты составляет не только слизь, но и иммуноглобулины типа A1 и A2, взаимодействующие с гликопротеинами слизи, а также гликокаликс с его способностью противостоять воздействию бактерий и химических веществ за счет оптимальных реологических характеристик [13]. Кроме того, защитная функция поддерживается благодаря метаболитам низкой молекулярной массы, что способствует предотвращению заражения слизистой оболочки как условно-патогенными, так и патогенными микроорганизмами.

В организме человека, наряду с микроорганизмами, приносящими пользу, также обитают бактерии, которые относятся к условно-патогенной группе, включающей в себя такие виды как кишечные палочки (*Escherichia*), энтерококки (*Enterococcus*), фузобактерии (*Fusobacterium*), пептострептококки (*Peptostreptococcus*), клостридии (*Clostridium*), эубактерии (*Eubacterium*) среди других. Эти микроорганизмы характеризуются потенциальной угрозой для здоровья, которая проявляется под воздействием определенных факторов, приводя к значительному увеличению их численности и ставя под угрозу здоровье человека.

Факторы, которые могут усугубить здоровье и привести к появлению бактериальных инфекций, включают неоднократное применение антибактериальных продуктов для личной гигиены, что негативно отражается на состоянии микрофлоры кожи и слизистых оболочек. Также к риску способствует использование антибиотиков широкого спектра без

контроля и самостоятельное лечение, что особенно опасно. Еще одна причина ослабления организма и развития инфекций - это низкий уровень иммунной защиты, возникающий на фоне других болезней.

Болезнетворные микроорганизмы и их более мягкие контрапарты, условно-патогенные бактерии, имеют различные воздействия на человеческий организм. В случаях, когда обнаруживаются даже минимальные количества патогенных бактерий, врачи склонны назначать лечение, чтобы предотвратить развитие заболеваний. Это связано с опасными токсинами, которые способны вырабатывать такие бактерии. Определенные бактерии выделяют два типа токсинов, которые наносят вред организму. К ним относятся эндотоксины, которые высвобождаются при гибели бактерий [13]. Интересно, что именно из-за этих токсинов состояние больного может временно ухудшиться в начале антимикробной терапии, подчёркивая сложность борьбы с инфекциями.

Некоторые бактериальные организмы имеют свойство производить токсины в ходе своего существования. Инфекционные заболевания, вызываемые этими токсинами, представляют серьезную угрозу здоровью из-за их способности вызывать обширное отравление организма, которое может привести к необратимым повреждениям тканей и в некоторых случаях даже к смерти.

В желудочно-кишечном тракте человека часто обнаруживаются определенные типы вредоносных микроорганизмов, среди которых наиболее распространены следующие виды [15]:

- Из группы бактерий вызывающих болезни ЖКТ, сальмонеллы зарекомендовали себя как частый возбудитель тяжелых расстройств. Лихорадка, диарея и рвота — типичные симптомы инфекции, известной как сальмонеллез. Отсутствие своевременного лечения может привести к критическим последствиям, включая почечную недостаточность и даже смерть пациента.

- Шигеллы относятся к патогенам, вызывающим дизентерию.

Это заболевание часто приводит к серьезному ухудшению состояния здоровья из-за интенсивной интоксикации, болевых симптомов и непрекращающейся диареи, однако редко представляет непосредственную угрозу жизни. Важнейшим аспектом медицинской заботы является предотвращение обезвоживания, вызванного большими потерями жидкости, что, к сожалению, часто становится причиной сложных последствий, включая воспалительные процессы, такие как пневмония. Если говорить о возбудителе болезни — холерном вибрионе (*Vibrio cholerae*), следует отметить, что холера продолжает оставаться распространенным заболеванием глобального масштаба, хотя в России случаи заболевания практически не встречаются.

Чрезмерная потеря жидкости через быстрое действие патогенов приводит к опасной ситуации для посетителей Африки, стран Латинской Америки и Юго-Восточной Азии, где холера является реальной угрозой [19]. Смерть наступает главным образом из-за сильного обезвоживания. Простое употребление воды не спасает от последствий болезни, требуется госпитализация и внутривенное введение жидкости для восстановления водного баланса.

### **1.5. Симбиоз микрофлоры кишечника и человека**

Кишечник человека представляет собой обширную и разнообразную микробную экосистему, которая эволюционировала совместно с нашим видом и необходима для здоровья человека. Человек обладает "расширенным геномом" из миллионов микробных генов, расположенных в кишечнике: микробиомом [11]. Этот мультигеномный симбиоз выражается на протеомном и метаболическом уровнях организма человека, и поэтому было высказано предположение, что люди представляют собой чрезвычайно сложный биологический "суперорганизм", в котором часть ответственности за регуляцию

метаболизма хозяина возложена на микробных симбионтов. Современная интерпретация кишечного микробиома основана на независимом от культуры молекулярном взгляде на кишечник, обеспечиваемом высокопроизводительными технологиями геномного скрининга. Кроме того, кишечный микробиом напрямую вовлечен в этиопатогенез ряда столь разнообразных патологических состояний, как ожирение, болезни системы кровообращения, воспалительные заболевания кишечника и аутизм [5]. Кишечная микробиота также влияет на метаболизм, токсичность лекарств, биодоступность пищевых калорий, состояние иммунной системы, реакцию организма и послеоперационное восстановление. Подра­зуме­ва­ет­ся, что количественный анализ кишечного микробиома и его активности подразумевает, что микробиом кишечника может напрямую регулироваться в интересах организма-хозяина.

Таким образом, кишечная микробиота выполняет большое количество важных функций, определяющих физиологию хозяина, таких как созревание иммунной системы, реакция кишечника на повреждение эпителиальных клеток, а также ксенобиотики и энергетический метаболизм. У большинства млекопитающих в кишечном микробиоме преобладают четыре бактериальных типа, которые выполняют эти задачи: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Филотипический состав может быть специфичным и стабильным у человека, и за 2-летний интервал у человека сохраняется более 60% филотипов кишечного микробиома. Это означает, что каждый хозяин имеет уникальную биологическую связь со своей кишечной микробиотой, и по определению это влияет на риск заболевания у человека.

### **1.6. Механизм взаимодействия микрофлоры ЖКТ и человека**

Прежде чем попасть внутрь тела человека, пища проходит начальный этап обработки во рту и глотке, где она подвергается как

механическому измельчению, так и химической модификации. Этот этап также включает оценку угрозы, которую могут представлять бактерии, способные проникнуть в организм. Процесс предварительного пищеварения начинается с слюны, которая не только начинает расщепление пищи, но и влияет на бактерии, проникающие вместе с пищей. Содержание бактерий в слюне колеблется, достигая в среднем до 100 миллионов микроорганизмов на миллилитр. Микрофлора ротовой полости человека достаточно разнообразна, включая стрептококки, стафилококки, лактобациллы, коринебактерии и множество анаэробных бактерий, общее число видов превышает 200 [12].

На слизистой оболочке, в зависимости от того, какие гигиенические продукты использует человек, может присутствовать примерно от 100 тысяч до 100 миллионов микроорганизмов на квадратный миллиметр. Главными защитниками здоровья ротовой полости являются стрептококки, включая виды как *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. viridans*, а также микроорганизмы, характерные для кожи и кишечного тракта. Среди них, *S. salivarius*, *S. sanguis*, и *S. viridans* отличаются особой способностью прикрепляться к слизистым оболочкам и зубному налету, что позволяет им эффективно препятствовать установлению в ротовой полости грибков типа *Candida* и стафилококков. Эти альфа-гемолитические стрептококки выделяются своей выраженной гистадгезией, благодаря чему они играют ключевую роль в поддержании колонизационной сопротивляемости полости рта.

В путешествии через пищеварительный тракт, конкретно через пищевод, микробное сообщество показывает высокую степень изменчивости. Эти микробы, в основном временные посетители из ротовой полости и глотки, не обладают способностью постоянно прикрепляться к стенкам пищевода. Доходя до желудка, они сталкиваются с препятствиями для их выживания, такими как агрессивная кислая среда, разлагающая активность ферментов, а также быстрая способность желудка избавляться

от содержимого, что в совокупности ограничивает их возможность для роста и размножения. В этой среде количество микроорганизмов сокращается до менее чем 1000-10,000 на миллилитр желудочного сока. В то время как некоторые микробы могут адаптироваться к жизни в свободном пространстве желудка, стенки желудка остаются для большинства из них недостижимой территорией.

В желудочной среде активно действуют кислотоустойчивые лактобациллы, классифицируемые в зависимости от их взаимодействия с муцином, в дополнение к некоторым видам почвенных бактерий и бифидобактериям. Лактобациллы, несмотря на их кратковременное присутствие в желудке, способны не только оказывать антибиотическое воздействие, но и временно заселять местный микробиотоп пристеночной области [9]. Обычно большинство микроорганизмов, попавших в желудок, уничтожаются благодаря действию защитных механизмов. Однако, когда нарушается функционирование слизистой оболочки или иммунобиологических факторов, некоторые микроорганизмы могут найти убежище и процветать в этой среде. При этом особенно отмечается закрепление в желудке популяции *Helicobacter pylori* за счет их патогенных характеристик.

Среди ключевых задач, выполняемых тонкой кишкой, выделяются разложение содержимого на уровне поверхности и внутри полости, абсорбция питательных элементов и их дальнейшее усвоение, выделение определённых веществ, а также обеспечение защиты от внешних воздействий [8]. В этом контексте, наряду с участием химических, ферментативных и механических аспектов, нельзя недооценить значимость естественной микрофлоры тонкой кишки. Эта микрофлора активно вовлечена не только в процессы разложения пищевых компонентов, как на поверхности, так и внутри, но и играет ключевую роль в поглощении питательных веществ. Таким образом, тонкая кишка представляет собой

критически важное звено в системе, которая поддерживает баланс и здоровье микрофлоры, прилегающей к стенкам органа.

Различия в распределении микроорганизмов в человеческом кишечнике проявляются как в характеристиках обитания внутренних и прилегающих к стенкам мест, так и по всей длине кишечника. В отличие от внутренней среды кишечника, где состав и плотность микробных сообществ могут значительно меняться, поверхность стенок кишечника обеспечивает более устойчивую среду для микробов, особенно тех, которые могут адгезировать к муцинам в слизистых оболочках [11].

В начальном сегменте тонкой кишки, в основном, обнаруживается ограниченное разнообразие грамположительных микроорганизмов, включая лактобациллы, стрептококки и некоторые виды грибов, подчёркивая уникальность микробного ландшафта кишечника в зависимости от его участка.

В содержании кишечника, количество микроорганизмов начинается от 10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup> микробов на миллилитр и заметно увеличивается по направлению к более дальним участкам тонкого кишечника, достигая до 10<sup>8</sup> микробов на миллилитр. В этом процессе в кишечной флоре начинают присутствовать новые виды микроорганизмов, среди которых находятся энтеробактерии, бактероиды и бифидобактерии, обогащая биологическое разнообразие.

Получение переваренных пищевых остатков из тонкого кишечника, который неспособен их дальше обработать, является начальной задачей толстой кишки. За период от 12 до 36 часов эти остатки преобразуются в твердую массу, известную как кал, которая затем удаляется из организма. Важными задачами толстой кишки также являются хранение и удаление этой массы, доокончательное разложение пищи, абсорбция и выведение воды, присвоение определенных метаболитов, питательных веществ, электролитов и газов [10]. Кроме того, она ответственна за формирование

каловых масс и их обезвреживание, контроль за их выведением и поддержание защитных функций организма.

В содержании кишечника человека доминируют эубиотические микроорганизмы, играющие ключевую роль во всех его функциях. В толстой кишке обитает огромное число микробов, достигающее от  $10^{10}$  до  $10^{12}$  колониеобразующих единиц на каждый миллилитр. Интересно, что микробы составляют до 60% объема стула [19]. В норме, животный мир нашего кишечника на 90–95% состоит из анаэробных микроорганизмов, таких как бифидобактерии, лактобациллы, бактероиды, и другие, в то время как аэробные микроорганизмы, включая различные виды энтеробактерий и дрожжеподобные грибы, занимают лишь 5–10%. Эта микрофлора обеспечивает здоровую среду, преобладая на протяжении жизни человека.

В здоровом человеческом толстом кишечнике преобладают анаэробные бактерии, которые составляют до 97% всей микрофлоры, включая такие виды как бактероиды (в частности *Bacteroides fragilis*), анаэробные молочнокислые бактерии (к примеру, *Bifidumbacterium*), клостридии (*Clostridium perfringens*), анаэробные стрептококки, фузобактерии, эубактерии и вейлонеллы, благодаря анаэробной среде, в которой они процветают. В общем сложности, микробиота кишечника у здорового индивида включает в себя до 500 разнообразных видов микроорганизмов [6]. Основную массу среди них занимают облигатные анаэробы, достигая отметки в 92-95% от всей микрофлоры, включая бифидобактерии, лактобактерии и не наносящие вреда кишечные палочки, а также содержит некоторые виды непатогенных простейших и приблизительно десятков разновидностей кишечных вирусов, наряду с упомянутыми выше аэробными и анаэробными микроорганизмами.

Большинство микроорганизмов в микрофлоре не являются аэробными или факультативно-анаэробными. Однако среди тех, что присутствуют, выделяются колиформные бактерии, включая кишечную

палочку (*E.Coli*), и энтерококки, большинство из которых грамотрицательные.

Состояние и разнообразие микроорганизмов, включая бактерии такие как стафилококки, псевдомонады, протеи, грибы *Candida*, а также спирохеты, некоторые микобактерии, микоплазмы, простейшие и вирусы в толстом кишечнике, зависят от возраста человека и измеряются в колониеобразующих единицах на грамм фекалий [17]. Это микробное сообщество играет важную роль в поддержании здоровья кишечника, где клетки слизистой оболочки кишечника, колоноциты, работают как регуляторы, поддерживая баланс между нормальным и нарушенным состоянием микрофлоры, что является ключом к здоровой микробной экосистеме в кишечнике.

В состоянии гомеостаза, когда организм стремится поддерживать внутреннее равновесие, клетки кишечного эпителия – колоноциты – активно используют кислород, осуществляя процесс окислительного фосфорилирования [20]. Это действие приводит к уменьшению уровня кислорода в эпителии, создавая условия для развития гипоксии. Именно такая среда идеально подходит для жизнедеятельности анаэробных бактерий, которые не могут существовать в присутствии кислорода. Эти бактерии играют ключевую роль в переработке клетчатки в кишечнике, трансформируя её в вещества, которые затем ассимилируются организмом. Подобный взаимовыгодный процесс помогает не только поддерживать микробный баланс в кишечнике, но и обеспечивает организм необходимыми питательными веществами.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объектами исследования** являлись 123 штамма бактерий, полученных из ЖКТ пациентов.

**Предмет исследования.** Определение антибактериальных свойств бактерий микробиоты кишечника человека.

**Место проведения исследования:** Башкирский государственный медицинский университет. Институт развития образования. Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии. Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН.

**Метод исследования:**

**Получение изолятов из каловой массы.**

Для проведения микробиологических работ было подготовлено 10 пробирок, 10 чашек Петри, колбы, шпатели, петли, горелка, дистиллированная вода, различные порошки для приготовления питательных сред.

Подготовка питательных сред проводится в специальной комнате с оборудованием, включая автоклав, электрическую плиту и весы. Небольшое количество питательной среды можно приготовить в специальных колбах, в которых наливают дистиллированную воду. После проведения расчетов, нужное количество сухой питательной среды насыпается на весы со специальной бумагой. Для приготовления смеси на плите нагревается дистиллированная вода до определенной температуры, и затем к ней добавляется сухая питательная среда. Путем перемешивания стеклянной палочкой до растворения всех компонентов, смесь нагревается до кипения [6].

Способ приготовления питательной среды Сабуро: 74,0 г среды размешать в 1 л дистиллированной воды кипятить 2 мин до полного расплавления агара, профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в стерильные флаконы и стерилизовать автоклавированием при

температуре 121°C в течение 15 мин. Среду охладить до температуры 45-50°C, разлить в стерильные чашки Петри после застывания подсушить в течение (40-+5) мин.

Для придания среде селективных свойств в качестве ингибитора роста большинства сопутствующих бактерий рекомендуется применять 2% раствора теллурита калия (5,0 мл на 1 л готовой среды, охлажденной до температуры 45-50°C) или антибиотики.

Бактоагар Плоскирева: 55 г питательной среды размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 2 мин, периодически помешивая до полного расплавления агара. Среду охладить до температуры 45-50°C, разлить в чашки Петри слоем 5-6 мм и подсушить с открытыми крышками в течение 1,5 ч при температуре 18-25°C.

Готовая среда в чашках - прозрачная, коричневатого красного цвета.

Агар Эндо ГРМ: 37,0 г среды размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 2-3 мин до полного расплавления агара, фильтровать через ватно-марлевый фильтр, снова довести до кипения, охладить до температуры 45-50 °C и разлить в стерильные чашки Петри слоем 5-6 мм. После застывания среды чашки подсушить при температуре (37+-1)°C в течение 40-60 мин.

Готовую питательную среду необходимо использовать в день приготовления. Хранить до посева в темноте.

Среды: Плоскарева, Левина, Эндо агар используют для энтеробактерий.

Для создания питательного агара МРС в гранулированной форме начните с растворения 65,15 грамм смеси в одном литре чистой дистиллированной воды. После этого, доведите смесь до кипения, чтобы обеспечить полное растворение всех элементов. Затем, используя автоклавирование при давлении 1,1 атмосферы и температуре 121 градус по Цельсию, произведите стерилизацию смеси в течение 15 минут. После процедуры стерилизации охладите среду до температуры между 45 и 50

градусами Цельсия. Тщательно перемешайте и равномерно распределите по предварительно подготовленным стерильным чашкам Петри, пробиркам или флаконам.

MPC агар используют для лактобактерий.

Для приготовления энтерококк агара используют препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л воды дистиллированной, доводят до кипения и кипятят при постоянном перемешивании в течение 1 мин, охлаждают до температуры 45-50 С и разливают в стерильные чашки Петри слоем 3-4 мм. После застывания среды чашки с открытыми крышками подсушивают при температуре  $(37\pm 1)$  °С в течение 40-60 мин.

Для проверки чистоты, чашки Петри, содержащие готовую питательную среду, подвергают инкубации на протяжении 44-48 часов при строго контролируемой температуре в районе 37°С. В этот период ожидается полное отсутствие роста микроорганизмов на поверхности среды, что указывало бы на ее стерильность. В своем готовом состоянии, эта среда имеет вариации цвета от светло-розового до фиолетового, обеспечивая наглядный критерий для оценки чистоты и пригодности к использованию. Условия хранения предусматривают значительное влияние на срок использования чашек: при температуре от 2 до 8°С они остаются пригодными до 10 дней, тогда как при комнатной температуре от 18 до 25°С эта продолжительность сокращается до 3 суток. Важно отметить, что хранение должно происходить в защищенном от света месте для поддержания качества среды.

Данный агар используют для энтерококков.

Для приготовления желточно-солевого агара (ЖСА) сначала варится солевой агар: 108,0 г набора реагентов размешать в 1 л дистиллированной воды, довести до кипения, кипятить 2-3 мин до полного расплавления агара. Затем добавить 5% от объема среды желток куриного яйца. Среду

профильтровать через ватно-марлевый фильтр и стерилизовать автоклавированием в течение 15 мин при температуре  $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

Желточно-солевой агар используют для стафилококков.

Среду охладить до температуры  $45-50^\circ\text{C}$ , разлить в стерильные чашки Петри слоем 3-4 мм. После застывания среду в чашках подсушить, соблюдая правила асептики, при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 40-60 мин.

Светло-желтая среда, размещенная в чашках Петри, остается пригодной к использованию на протяжении десяти дней, если ее хранить в условиях с температурой в диапазоне от 2 до 8 градусов по Цельсию.

Бифидум среда: 50,0 г среды тщательно размешать в 1 л воды дистиллированной, кипятить в течение 1 мин, периодически перемешивая, до полного расплавления агара. Профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить по 9,0 мл в пробирки и стерилизовать автоклавированием при температуре  $112^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Стерильную среду можно хранить не более 2 суток при температуре  $(2-8)^\circ\text{C}$ , перед использованием регенерировать путем нагревания ее в кипящей водяной бане в течение 15-20 мин.

Через 4 дня среда микроскопируется на наличие грамположительных палочек (ветвистые). Затем пересеивается на чашку, на твердую среду бифидо агара. И устанавливается на термостат при 37 градусах на 4 дня.

Для создания среды для культивирования бифидобактерий следует произвести следующие шаги: начать с того, что нужно развести 49,3 грамма специализированного агарового порошка в одном литре воды, прошедшей дистилляцию. Важно обеспечить тщательное смешивание ингредиентов и довести смесь до кипения для того, чтобы гарантировать полное растворение всех компонентов. Затем полученный раствор необходимо поместить в предварительно подготовленные контейнеры, такие как пробирки или бутылочки.

Далее, обеспечивается стерильность среды путем процесса автоклавирования, который выполняется под давлением 1,1 атмосферы на протяжении 15 минут при температуре 121°C. После завершения процедуры стерилизации, раствор следует охладить до температуры примерно 50°C, перед тем как аккуратно распределить его по стерильным чашкам Петри для дальнейшего использования.

Для приготовления кровяного агара сначала варится питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГМ-Ф-АГАР): 33,5 г препарата размешать в 1 л дистиллированной воды кипятить 2 мин до полного расплавления агара. После остывания добавляется кровь в объеме 5% от объема среды. Фильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в стерильные флаконы и стерилизовать автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Среду охладить до температуры 45-50 °С, разлить в стерильные чашки Петри.

После застывания среды чашки подсушить при температуре (37+-1)°С в течение 40-60 мин.

Кровяной агар используют для всех микроорганизмов.

Среда Левина: 50,0 г среды Левина размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 3 мин до полного расплавления агара, профильтровать через ватный фильтр, стерилизовать автоклавированием в течение 20 мин при температуре 112 °С.

Среду после стерилизации охладить до температуры 45-50 С, разлить по 20 мл в стерильные чашки Петри (рисунок 1).



Рисунок 1 – Розлив питательных сред в чашки Петри.

После застывания среды, чашки со средой подсушить в течение 40-60 мин при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ , соблюдая правила асептики.

Готовая среда может быть использована в течение 7 суток при условии хранения при температуре от 2 до  $8^\circ\text{C}$ .

Тиогликолевая среда: 31,0 г препарата размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить в течение 2 мин, профильтровать через бумажный фильтр, разлить по 10 мл в стерильные пробирки и стерилизовать автоклавированием при температуре  $121^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

Питательная среда LB: Взвесить: 10 г 1% маннитол, 5 г 0,1% дрожжевой экстракт, 10 г 0,5% NaCl. Растворить в 800 мл дистиллированной или деионизованной воды. Довести до точного объема 1 л в мерном цилиндре.

Автоклавировать при  $121^\circ\text{C}$  в течение 20 минут.

После охлаждения перемешать колбу, чтобы перемешать компоненты среды.

Для получения чистых культур взвешивается 1г кала и разводится в стеклянной посуде 9 мл физиологического раствора в соотношении 1:10.

Выстраивается в ряд 10 пробирок и в каждую пробирку наливается по 9 мл изотонического раствора.

Из посуды, где был разведен кал, пипеткой отмеряют 1 мл раствора, добавляют в первую пробирку и перемешивают. Затем из этой же пробирки пипеткой набирают 1 мл и добавляют во вторую пробирку. Из второй – в 3-ю, и так далее продолжают наливать до 10-й пробирки (рисунок 2).

Из 10-й пробирки 1 мл взятого раствора сбрасывается в отходы.

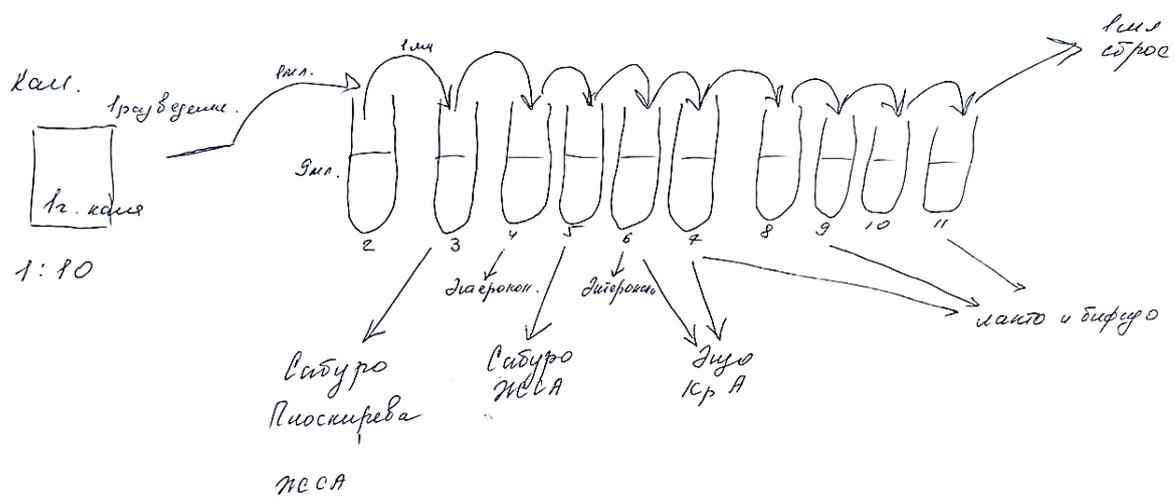


Рисунок 2 – Схема высева бактерий из каловой массы.

Далее набирают пипеткой 100 мкл из первой пробирки и высевают на среду Плоскирева и Левина. Пробирку со вторым разведением – на среду Сабуро, Плоскарева и ЖСА. Третью пробирку высевают на среду Энтерококк агар. Четвертую – на среды Сабуро, ЖСА. Из пятой пробирки 100 мкл высеивают на среду Энтерококк агар, Эндо и Кровяной агар.

Шестая пробирка сеется на среды Эндо и кровяной агар. Седьмая – на МРС агар.

8, 9, 10 пробирки с разведением кала высевают по 500 мкл в три пробирки содержащимися по 5 мл бифидо бульона.

Все манипуляции после высеваания продолжаются растираем с использованием шпателя по среде до высыхания и ставится в термостат.

Каждая среда устанавливается на определённое время.

Среда Сабуро ставится на термостат при 37 градусах на 4 дня.

Среду ЖСА и Энтерококк агар устанавливается на 37 градусов на 2 дня.

Остальные среды ставятся на сутки при 37 градусах.

На 37 градусов в термостат с подачей CO<sub>2</sub> ставятся среды МРС (2 дня) и бифидо бульон(4 дня).

По истечению необходимого времени для каждой среды вынимаются чаши из термостата и визуально наблюдаются выросшие колонии.

Для получения чистой культуры методом штрихования по чашке рассеиваются колонии каждого типа. И снова среды ставятся на термостат для каждого типа на столько дней, сколько описывали ранее (рисунок 3). Затем чаши вынимаются.

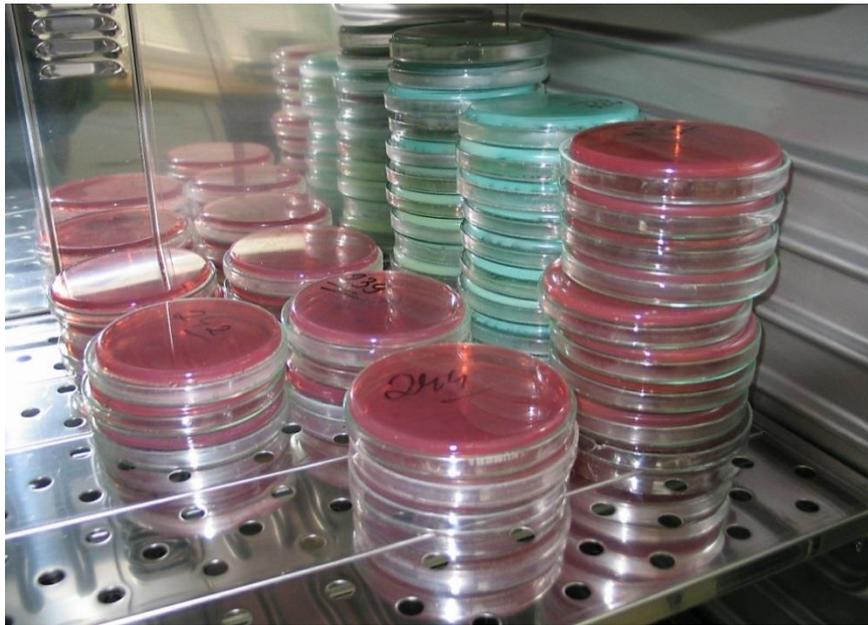


Рисунок 3 – Чашки Петри в термостате.

### **Определение бактерий на автоматизированном масс-спектрометре AUTOF MS1600/2600.**

Идентификационный процесс микроорганизмов на устройствах AUTOF MS1600/2600 реализуется через отслеживание их чистых культур. Уникальность каждого организма распознается по специфическому составу белков, который действует аналогично уникальному биологическому коду - его протеомной отметке, или так называемому "белковому отпечатку пальцев". Преимущественно, идентификация зависит от рибосомальных белков, общих для всех микроорганизмов. Техника включает в себя превращение материала, составляющего организмы, в ионизированные частицы при помощи лазера, делая возможным распознавание по этим уникальным биомаркерам.

В процессе, известном как ионизация, происходят комплексные превращения. Сначала, специальное вещество, служащее матрицей ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота), в сочетании с изучаемыми белками микроорганизмов подвергается превращению в газовую фазу. В этой фазе, молекулы матрицы активно взаимодействуют с белками, наделяя их

положительным электрическим зарядом. Последующий этап включает в себя перемещение таких ионизированных молекул к масс-спектрометру благодаря применению электрического поля, значительно упрощая их передвижение в условиях глубокого вакуума. Этот перемещенный заряженный воздух, содержащий белки, затем подвергается ускоренному движению в направлении к детектору внутри анализатора, где скорость их движения определяется на основе атомных масс, делая более легкие ионы быстрее, что обеспечивает их последующее обнаружение и анализ.

Ионы, после их ускорения, демонстрируют разное время пролета через установленное пространство, что зависит от их массы и заряда, выраженного через отношение  $m/z$ . Это позволяет программе анализировать их по времени пролета через дистанцию и формировать масс-спектр. В масс-спектре, который представляет собой график, распределение ионов по массам размещается вдоль горизонтальной оси (ось абсцисс), отражая их соотношение  $m/z$ , в то время как вертикальная ось (ось ординат) показывает интенсивность зафиксированных детектором ионов в различные временные промежутки. Для улучшения визуализации необходимо использовать качественные изображения или графики. Завершается процесс сравнением полученных спектров с базой данных масс-анализатора, что позволяет, благодаря информации о массе специфических белков, идентифицировать микроорганизмы.

Чтобы успешно идентифицировать возбудителей с использованием AUTOF MS1600/2600, необходимы специализированное программное обеспечение и база данных (рисунок 4). Идентификационный процесс делится на две ключевые стадии: в первую очередь подготавливают чистую культуру исследуемого микроорганизма, за тем следует сам процесс идентификации.



Рисунок 4 – Автоматизированный масс-спектрометр для идентификации микроорганизмов AUTOF MS1600/2600.

К приготовлению культур приступают, смешивая на базе аналитической подложки избранные микроорганизмы, изъятые из чистых культур, отдельных колоний или сред обогащения, с матричным раствором. Всего 10 минут отводится на обработку двадцати четырёх культур, в то время как для обслуживания девяноста шести образцов необходимо 33 минуты.

Что касается процесса определения культур, то обработанная проба затем доставляется в масс-анализатор, где её подвергают ионизации с использованием лазерных всплесков. После этого, определение типа культуры происходит автоматически с применением масс-спектрометрии, исключая необходимость вручную вмешиваться в процесс. Процедура идентификации для каждого микроорганизма занимает менее двух минут.

Идентификационная процедура с применением AUTOF MS1600/2600 занимает всего 12 минут для анализа 24 образцов и 43 минуты для обработки 96 образцов. Эта технология предоставляет значительные преимущества, среди которых:

- Оперативное проведение анализов без необходимости в длительной фенотипической идентификации, избавляя от множественных сложностей и нестабильности результатов.

- Сниженные требования к профессиональным навыкам операторов, облегчая использование оборудования.

- Отсутствие необходимости в специализированных расходных материалах, делая метод более экономичным.

- Быстрая подготовка проб, требующая всего 5 минут на каждый образец, ускоряя общий процесс анализа.

- Возможность тщательного изучения разнообразных видов микроорганизмов, включая мицелиальные грибы, дрожжи, а также грамположительные и грамотрицательные бактерии, благодаря высокой чувствительности устройства, способного распознавать от 100 000 до 1 000 000 клеток.

- Экстремально высокая скорость идентификации – образец анализируется всего за одну минуту, а комплексное исследование 96 проб занимает лишь полтора часа.

- Точность видовой идентификации превышает 98%, обеспечивая надежные результаты.

- Заметное снижение затрат на каждое исследование – в 12-96 раз, что в среднем составляет 37-кратное уменьшение стоимости по сравнению с традиционными фенотипическими методами анализа, как ручными, так и автоматизированными[3].

В эппендорфы в количестве 10 штук наливается по 1 мл тиогликолевой среды.

Вначале пересева колоний из чашек Петри, используется метод охлаждения бактериальной петли после ее нагрева над огнем. Это обеспечивает безопасное прикосновение к агару, исключая его плавление. Чистые колонии микроорганизмов аккуратно отбираются петлей из каждой чашки и перемещаются в эппендорфы для дальнейших исследований. Процесс завершается повторным прокаливанием используемой петли, чтобы уничтожить все следы микробных культур или потенциально инфицированные материалы, предотвращая контаминацию (рисунок 5)

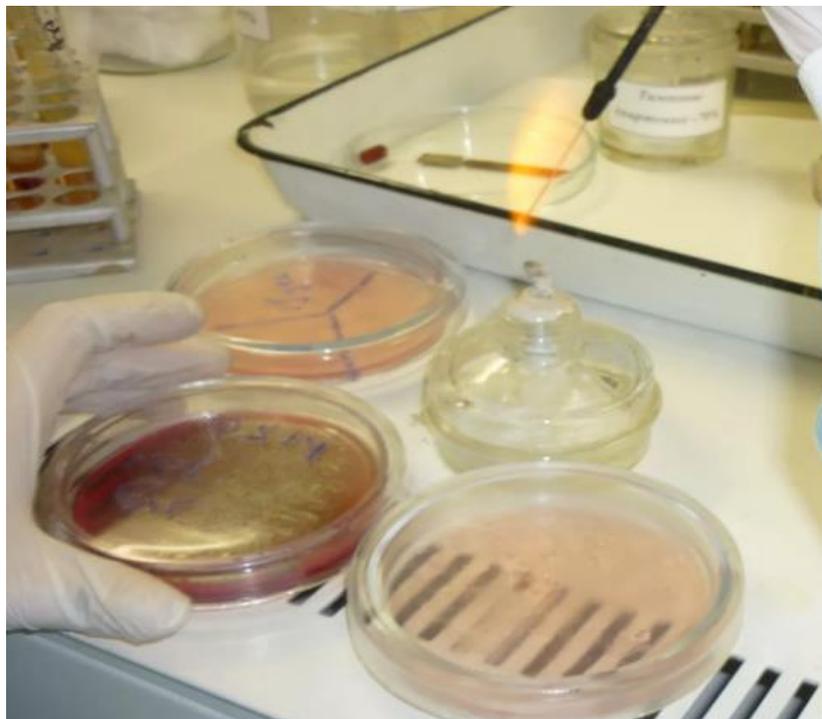


Рисунок 5 – Петлю прожигают над пламенем.

Для обеспечения стерильности после использования в процедуре засева, инструменты, такие как шпатели и пипетки, помещают в раствор для дезинфекции. На каждой чашке Петри с обратной стороны, а также на пробирках, в области находящейся выше средней части, делают пометки [5]. В этих пометках указывают наименование внесенного образца, уникальный номер анализа и дату проведения процедуры засева. Эппендорфы ставят на термостат-шейкер при 37 градусах на 2 дня для размножения бактерий в жидкой среде. По истечении времени вынимаются эппендорфы, откручиваются на центрифуге на 15 тысячах оборотов на 1 минуту.

В результате на дне образуется осадок и сверху над осадочная жидкость.

Не задевая осадок на дне, над осадочную жидкость из всех десяти пробирок пипеткой переливаются в чистые эппендорфы.

#### **Определение антибактериальной активности исследуемых штаммов.**

Для получения бактериального газона использовали ночную культуру рекомбинантного штамма *E. coli* JW5503( $\Delta$ tolC), выращенную в питательной среде LB (lysogeny broth) с добавлением ампициллина (50 мкг/мл). На чашку Петри с агаризованной питательной средой LB (1% маннитол, 0,1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl) наносили 3 мл суточной культуры бактерий, инкубированной в термостатируемом шейкере ES-20 (BioSan, Латвия) при 37°C. Покачивали чашку Петри до равномерного распределения жидкости, оставшуюся часть которой удаляли, используя дозатор со сменными стерильными наконечниками. После этого чашки Петри оставляли приоткрытыми для подсушивания посева в боксе микробиологической безопасности БМБ-II "Ламинар-С"-1,2. Далее бактерии инкубировали в термостате при 28°C в течение суток.

Далее на бактериальный газон наносили по 0,5 мкл непосредственно суспензии клеток и по 5 мкл надосадочной жидкости. Чашки помещали на

сутки в термостат - 28°C для ризобиального газона и 37°C для *E. coli*. По окончании инкубации проводили визуальную оценку зон подавления роста газона бактерий с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США). Результаты наличия антибактериальной активности оценивали по размеру пятна подавления роста и, при наличии, цвету ореола вокруг него для *E. coli* (синтез флуоресцентного белка с Dualrep2).

**Для определения механизма действия антибактериальной активности** образцов использовали газон клеток *E. coli* JW5503( $\Delta$ tolC) с плазмидой pDualRep2 (рис. 1. E и F). Вектор pDualrep2 содержит гены двух флуоресцентных белков: RFP (максимум испускания 584 нм) и Katushka2S (максимум испускания 635 нм). В случае, если антибиотик действует на процесс синтеза белка – задержка работы рибосомы (например, RiPP пептиды, эритромицин), экспрессия дальнего красного белка Katushka2S возрастает (рисунок 6).

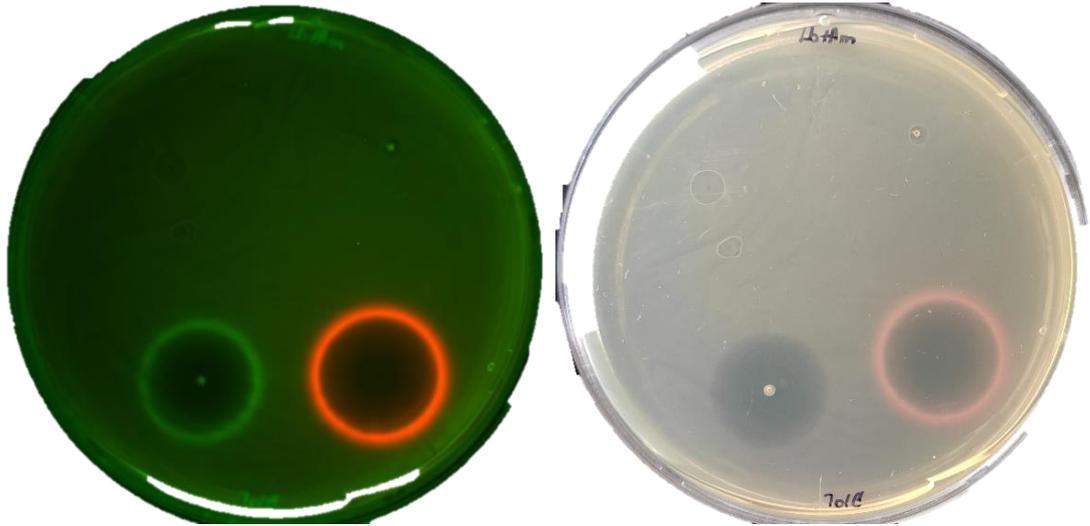


Рисунок 6 – Примеры подавления роста бактерий на газоне клеток *E. coli* JW5503( $\Delta tolC$ ) с плазмидой pDualRep2 в гель-документирующей системе ChemiDoc MP (А) и при дневном освещении (Б). Контрольные антибиотики: левофлоксацин (1), эритромицин (2).

Экспрессия красного флуоресцентного белка RFP увеличивается в случае включения в клетке SOS-ответа (левофлоксацин) на массовое повреждение ДНК (левофлоксацин) (Osterman et al. 2016). Наличие антибактериальной активности веществ оцениваются по размеру пятна подавления роста и, при наличии, цвету ореола вокруг него на газоне клеток *E. coli* с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США)

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Микрофлора ЖКТ представляет собой метаболически активную и сложную экосистему, состоящую из сотен тысяч микроорганизмов – бактерий, вирусов и некоторых эукариот. Подобно невидимому чулку, биоплёнка покрывает все слизистые нашего организма. Микробиота объединяет более чем  $10^{14}$  (сто миллиардов) клеток микроорганизмов, что в 10 раз превышает число клеток самого организма. Бактерии в норме находятся в содружественных отношениях с организмом человека: организм хозяина предоставляет среду обитания и питательные вещества, микроорганизмы защищают организм от патогенных возбудителей, способствуют поддержанию нормальных иммунологических, метаболических и моторных функций. Но в некоторых случаях нормальные (симбиотические) отношения нарушаются и это состояние называется дисбиозом. Причиной тому могут быть различные условия, связанные с нарушением иммунитета или попаданием ЖКТ компонентов, приводящих к изменению устоявшегося соотношений бактерий, что может сильно нарушить взаимосвязь между организмом хозяина и микробиотой. Такими компонентами могут быть пагубно влияющие на микроорганизмы ЖКТ химические и биологические компоненты (антибиотики, яды, и.д.) или другие микроорганизмы, которые могут нарушить устоявшиеся связи за счет изменения соотношения состава микрофлоры. Микроорганизмы находятся постоянно во взаимосвязи с друг другом и для завоевания пространства для существования применяют различные стратегии. Одними из механизмов общения микроорганизмов являются компоненты, выделяемые бактериями в окружающую среду. В данной работе мы исследовали использование микрофлорой ЖКТ в качестве таких сигналов веществ антибактериальной природы.



Было выявлено что больше всего штаммов бактерий относилось к виду *Enterococcus faecium* (9,8% от общего количества) (таблица 1).

Таблица 1 – Видовое соотношение изолятов в исследуемой выборке

	Название	Количество	Процентное соотношение
1.	<i>Enterococcus faecium</i>	12	9,8%
2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	7,4%
3.	<i>Enterococcus faecalis</i>	9	7,4%
4.	<i>Lactobacillus fermentum</i>	8	6,6%
5.	<i>E.coli</i>	8	6,6%
6.	<i>Streptococcus salivarius</i>	7	5,8%
7.	<i>Lactobacillus salivarius</i>	5	4,2%
8.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	5	4,2%
9.	<i>Staphylococcus capitis</i>	4	3,2%
10.	<i>Staphylococcus hominis</i>	4	3,2%
11.	<i>Staphylococcus warneri</i>	3	2,4%
12.	<i>C. albicans</i>	3	2,4%
13.	<i>Neisseria sp.</i>	3	2,4%
14.	<i>Proteus mirabilis</i>	3	2,4%
15.	<i>M. luteus</i>	3	2,4%
16.	<i>Corynebacterium amycoletum</i>	2	1,6%
17.	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2	1,6%
18.	<i>Streptococcus oralis</i>	2	1,6%
19.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	1,6%
20.	<i>Lactobacillus crispatus</i>	2	1,6%
21.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1,6%
22.	<i>Weissella confusa</i>	2	1,6%

23.	<i>Weissells cibaria</i>	2	1,6%
24.	<i>Corynebacterium imitans</i>	1	0,8%
25.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	0,8%
26.	<i>Leuconostoc cremoris</i>	1	0,8%
27.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0,8%
28.	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	1	0,8%
29.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	0,8%
30.	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	0,8%
31.	<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	0,8%
32.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,8%
33.	<i>Enterobacter kobei</i>	1	0,8%
34.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0,8%
35.	<i>Streptococcus mutans</i>	1	0,8%
36.	<i>Kocuria rosea</i>	1	0,8%
37.	<i>S. epid</i>	1	0,8%
38.	<i>Cor.striatem</i>	1	0,8%
39.	<i>Ent.gallinerum</i>	1	0,8%
40.	<i>L.mucosae</i>	1	0,8%
41.	<i>Str.gallolyficus</i>	1	0,8%
42.	<i>Ent.durans</i>	1	0,8%
43.	<i>Pr.Aeruginosa</i>	1	0,8%
44.	<i>Lactobacillus sp.</i>	1	0,8%
		123	100%

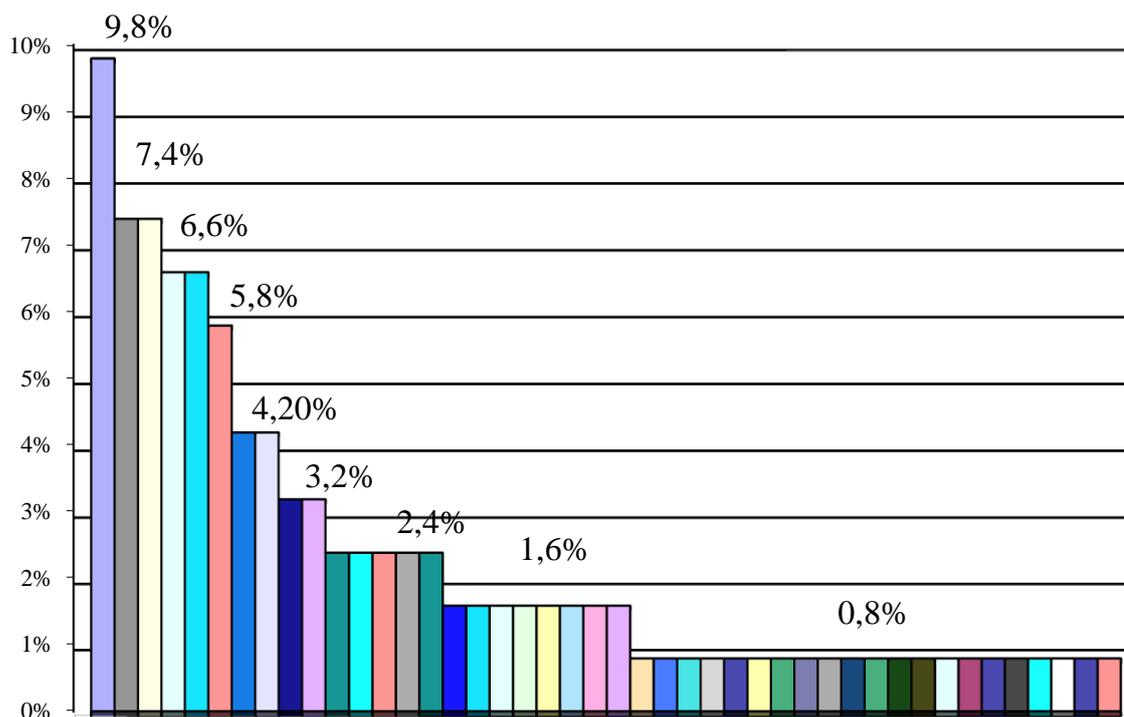


Рисунок 8 – Процентное видовое соотношение изолятов в исследуемой выборке. *Enterococcus faecium* в количестве 12 микроорганизмов составило 9,8%. *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus faecalis* в количестве 9 микроорганизмов составило 7,4%. *Lactobacillus fermentum* и *E. coli* в количестве 8 микроорганизмов составило 6,6%. *Streptococcus salivarius* в количестве 7 микроорганизмов составило 5,8%. *Lactobacillus salivarius* и *Lactobacillus paracasei* в количестве 5 микроорганизмов составило 4,2%. *Staphylococcus capitis* и *Staphylococcus hominis* в количестве 4 микроорганизмов составило 3,2%. *Staphylococcus warneri*, *C. albicans*, *Neisseria sp*, *Proteus mirabilis* и *M. luteus*. в количестве 3 микроорганизмов составило 2,4%. *Corynebacterium amycoletum*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Lactobacillus crispatus*, *Klebsiella pneumonia*, *Weissella confuse*, *Weissella cibaria* в количестве 2 микроорганизмов составило 1,6%. *Corynebacterium imitans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc cremoris*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus pseudomycooides*, *Acinetobacter lwoffii*,

*Staphylococcus cohnii* 1, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter kobei*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Kocuria rosea*, *S. epid*, *Cor.striatem*, *Ent.gallinerum*, *L.mucosae*, *Str.galloylicus*, *Ent.durans*, *Pr.Aeruginosa*, *Lactobacillus sp.* в количестве 1 микроорганизма составило 0,8%.

Далее все полученные образцы микроорганизмов были анализированы на антагонистическое действие против рекомбинантного штамма *E. coli* JW5503( $\Delta$ tolC) с плазмидой pDualRep2, позволяющей выявить механизм антибактериального действия (рисунок 9).

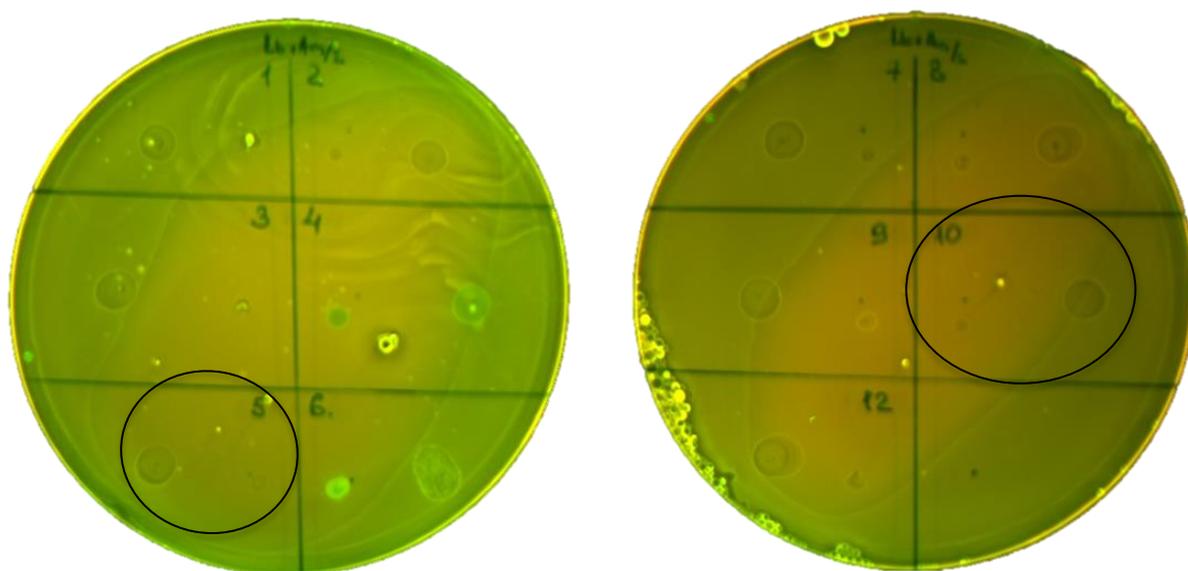


Рисунок 9 – Определение антибактериальной активности штаммов бактерий: 1 – *Streptococcus salivarius* (ротовая жидкость); 2 – *Streptococcus oralis* (зубной камень); 3 – *Streptococcus salivarius* (ротовая жидкость); 4 – *Staphylococcus hominis* (ротовая жидкость); **5 – *Staphylococcus haemolyticus* (кал)**; 6 – *Lacto. Salivarius* (зуб камень); 7 – *Enterococcus faecium* (зубная жидкость); 8 – *Enterococcus faecium* (мочевой камень); 9 – *Candida albicans* (зубной камень); **10 – *E.coli* (кал)**; 12 – *Klebsiella*

рнеумоніае (мочевой камень). Использованные в данной работе образцы отмечены кружком на фото и жирным шрифтом в подписи к рисунку.

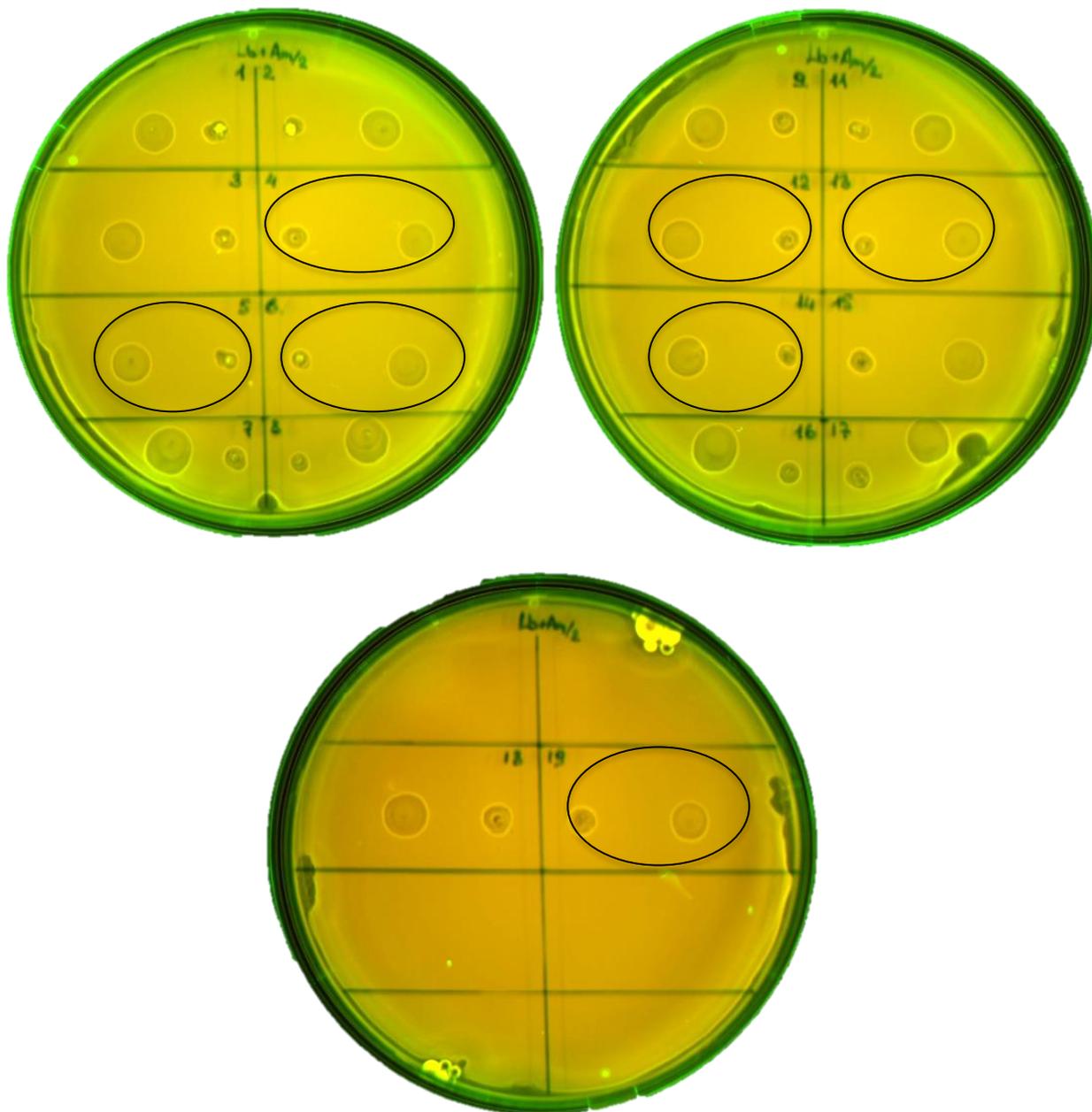


Рисунок 10 – Определение антибактериальной активности штаммов бактерий: 1 – *Enterococcus faecalis* (моча); 2 – *Lactobacillus fermentum* (зубной камень); 3 – *Lactobacillus fermentum* (зубной камень); 4 – ***Staphylococcus warneri*** (кал); 5 – ***Klebsiella pneumonia*** (кал); 6 – ***Corynebacterium amycocletum*** (кал); 7 – *Corynebacterium imitans* (вл); 8 – *Leuconostoc cremoris* (зубной камень); 9 – *Enterococcus faecalis* (зубной); 10 – *Enterococcus faecalis* (зубной); 11 – *Staphylococcus epidermidis* (зубной)

камень); **12** – *Enterococcus faecalis* (кал); **13** – *Pseudomonas stutzeri* (кал); **14** – *Bacillus pseudomyoides* (кал); 15 – *Acinetobacter lwoffii* (зубной камень); 16 – *Enterococcus faecalis* (камень); 17 – *Enterococcus faecalis* (моча); 18 – *Bacillus pseudomyoides* (центр. зона); **19** – *M. luteus* (кал). И использованные в данной работе образцы отмечены кружком на фото и жирным шрифтом в подписи к рисунку.

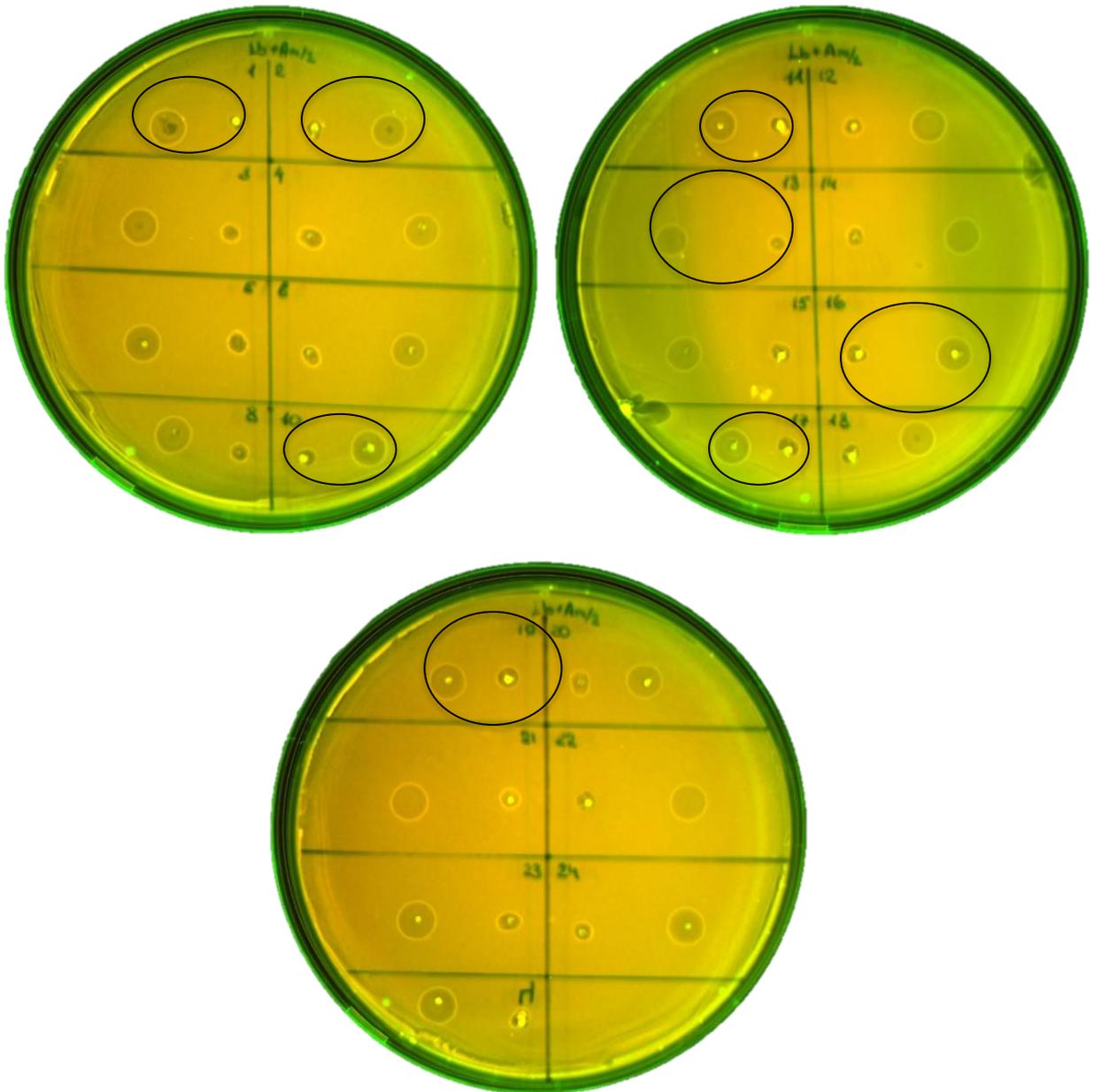
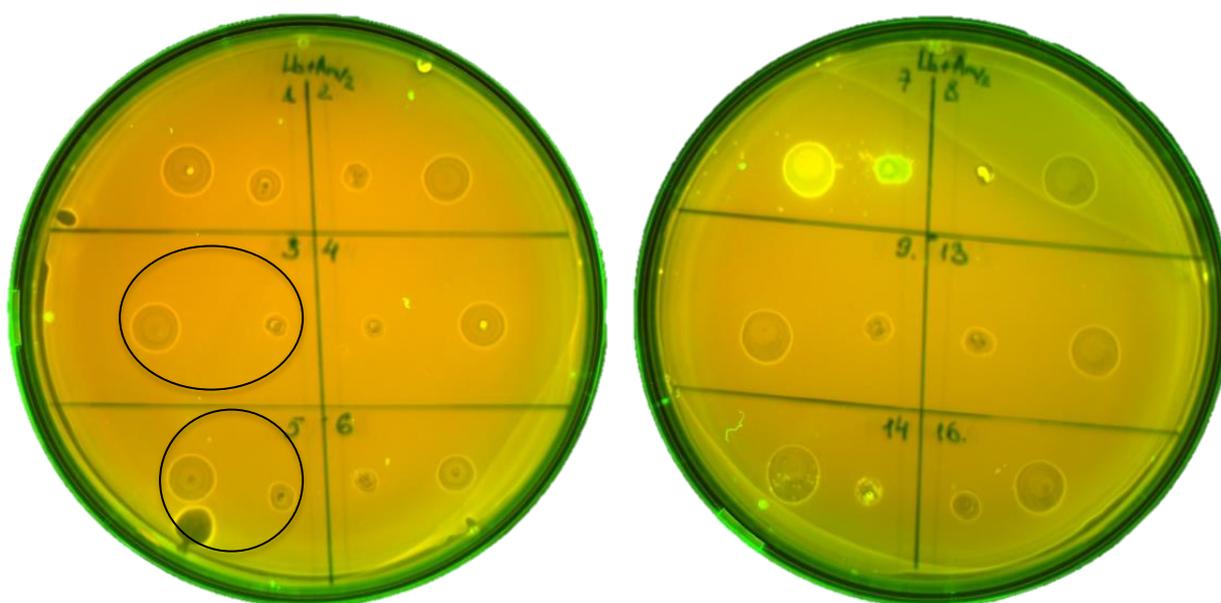


Рисунок 11 – Определение антибактериальной активности штаммов бактерий: **1** – *Staphylococcus hominis* (кал); **2** – *Staphylococcus cohnii*

(кал); 3 – *Staphylococcus epidermidis* (кам.лох.); 4 – *Staphylococcus haemolyticus* (моча); 5 – *Staphylococcus capitis* (моча); 6 – *Staphylococcus epidermidis* (кам.лох.); 8 – *Lacto. salivarius* (зубной камень); 9 – *Staphylococcus hominis* (рот.жидкость); **10 – *Staphylococcus epidermidis* (кал)**; **11 – *Staphylococcus epidermidis* (кал)**; 12 – *M.luteus* (зуб.камень); **13 – *E.coli* (кал)**; 14 – *Lactobacillus fermentum* (зубной камень); 15 – *Enterococcus faecium* (мочевой камень); **16 – *Enterococcus faecium* (кал)**; **17 – *Klebsiella aerogenes* (кал)**; 18 – *Staphylococcus aureus* (уретра); **19 – *Staphylococcus warneri* (кал)**; 20 – *Candida albicans* (зубной камень); 21 – *Streptococcus oralis* (зубной камень); 22 – *Enterococcus faecalis* (зубной); 23 – *Staphylococcus capitis* (моча); 24 – *Enterococcus faecium* (мочевой камень).  
Использованные в данной работе образцы отмечены кружком на фото и жирным шрифтом в подписи к рисунку.



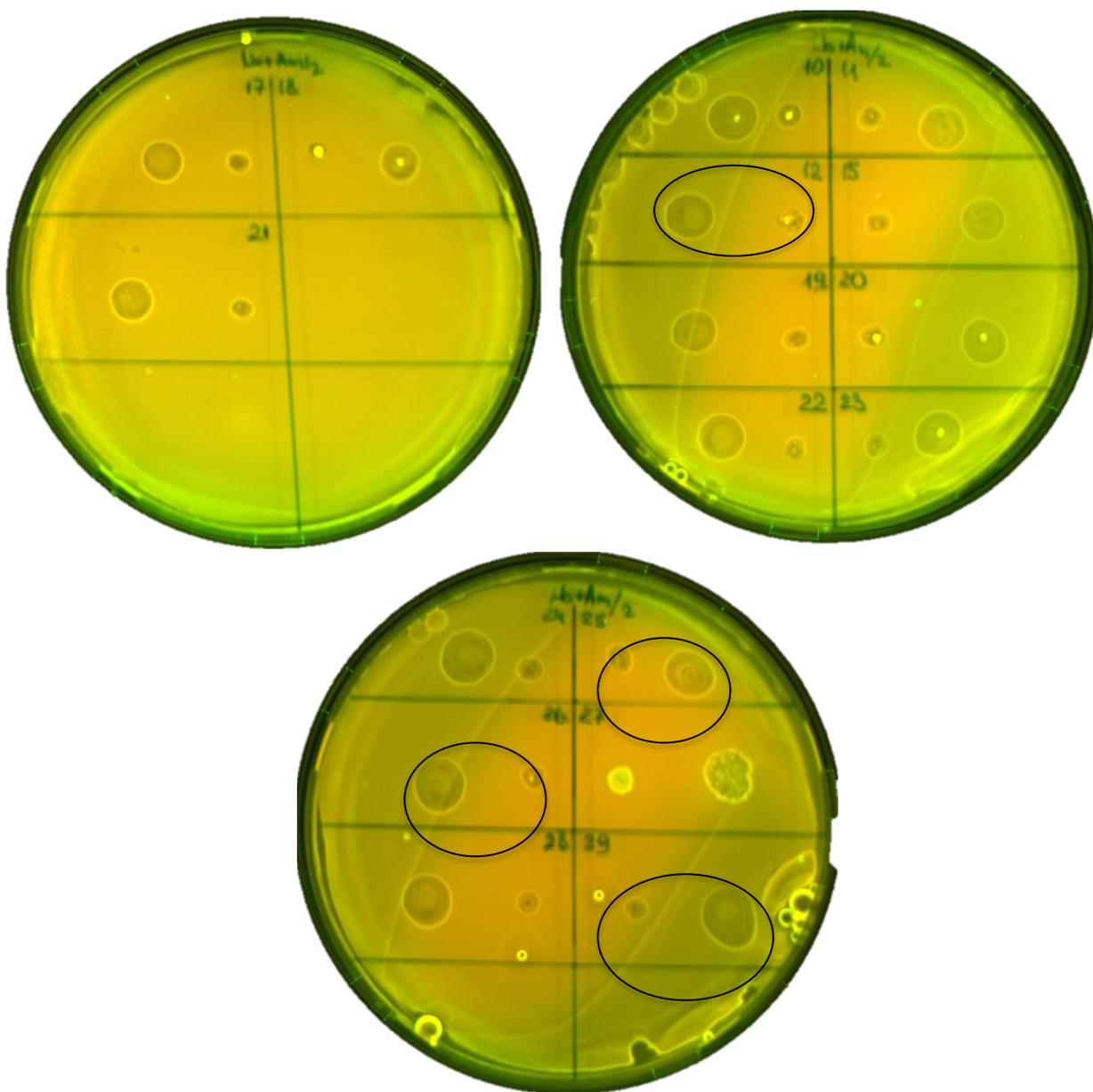


Рисунок 12 – Определение антибактериальной активности штаммов бактерий: 1 – *Staphylococcus epidermidis* (зубной камень); 2 – *Neisseria* spp. (рот. жидкость); 3 – ***Corynebacterium amycoletum*** (кал); 4 – *Streptococcus salivarius* (ротовая жидкость); 5 – ***Lactobacillus paracasei*** (кал); 6 – *Streptococcus salivarius* (ротовая жидкость); 7 – *Neisseria* spp. (рот. жидкость); 8 – *Enterobacter kobei* (рот. жидкость); 9 – *Streptococcus pneumoniae* (рот. жидкость); 10 – *Staphylococcus epidermidis* (рот. жидкость); 11 – *Staphylococcus epidermidis* (рот. жидкость); 12 – ***M. luteus*** (кал); 13 – *Staphylococcus epidermidis* (зубной камень); 14 – *Streptococcus*

mutans (зубной камень); 15 – *Lactobacillus paracasei* (зубной камень); 16 – *Lactobacillus fermentum* (зубной камень); 17 – *Weissella cibaria* (рот. жидкость); 18 – *Lactobacillus crispatus* (ур.); 19 – *Lactobacillus crispatus* (ткань); 20 – *Staphylococcus epidermidis* (кам.лох.); 21 – *Streptococcus salivarius* (ротовая жидкость); 22 – *Streptococcus salivarius* (зубной камень); 23 – *Staphylococcus epidermidis* (моча); 24 – *Kocuria rosea* (кам.лох.); **25 – *Enterococcus faecium* (кал); 26 – *Staphylococcus warneri* (кал); 27 – *Staphylococcus epidermidis* (зубной камень); 28 – *Lactobacillus fermentum* (зубной камень); 29 – *Lactobacillus paracasei* (кал).** Исползованные в данной работе образцы отмечены кружком на фото и жирным шрифтом в подписи к рисунку.

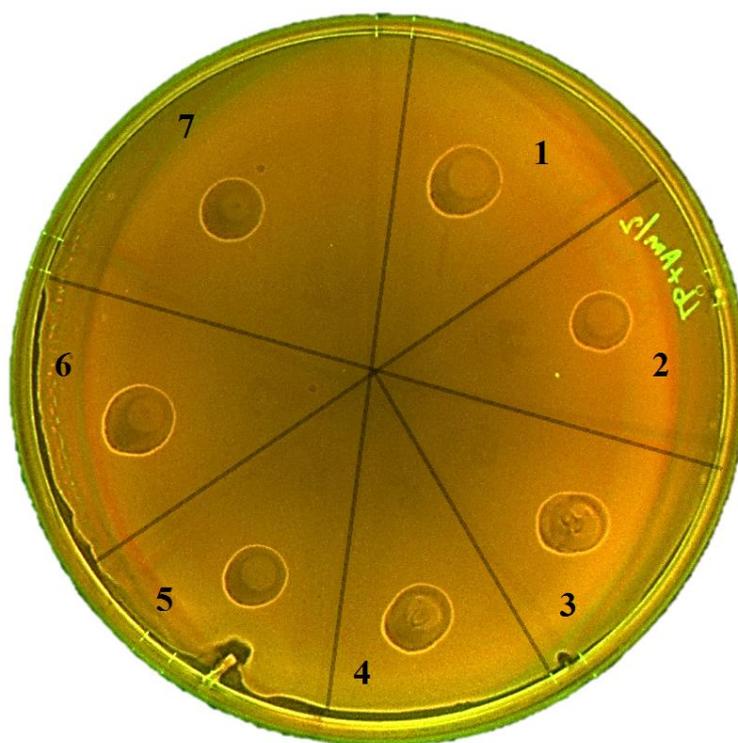


Рисунок 13 – Определение антибактериальной активности штаммов бактерий, полученных из каловой массы пациентов, подверженных ожирению. 1 – *Lacto.fermentum*; 2 – *Lacto.fermentum*.; 3- *Lacto.rhamnosus*; 4 – *Lacto.paracasei*; 5 – *Weissella confusa*; 6 – *Weissella confusa*; 7 - *Weissella cibaria*.

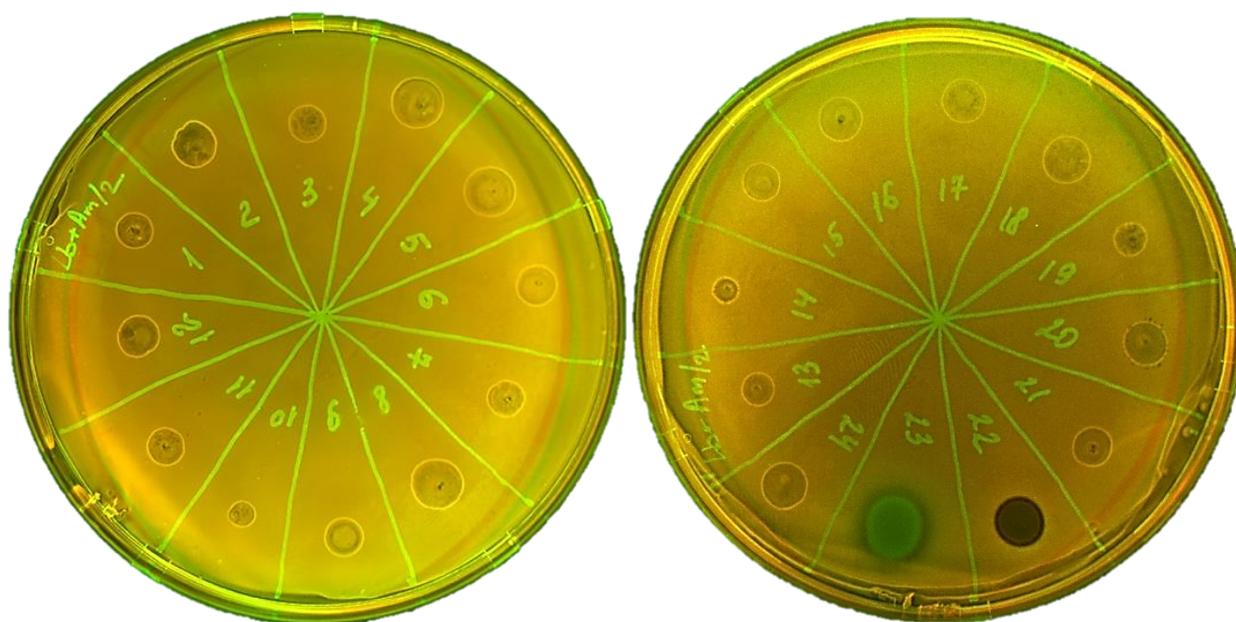


Рисунок 14 – Определение антибактериальной активности штаммов бактерий, полученных из каловой массы пациентов, подверженных ожирению: 1 – *Proteus mirabilis*; 2 – *S. epid*; 3 – *S. capitis*; 4 – *Cor. striatem*; 5 – *E. faecium*; 6 – *Pr. mirabilis*; 7 – *E. faecalis*; 8 – *Ent. gallinerum*; 9 – *Ent. faecium*; 10 – *L. mucosae*; 11 – *L. paracasei*; 12 – *L. salivarius*; 13 – *Str. parasanguinis*; 14 – *Str. gallolyticus*; 15 – *Ent. faecalis*; 16 – *Ent. durans*; 17 – *E. coli*; 18 – *E. coli*; 19 – *E. coli*; 20 – *E. coli*; 21 – *E. coli*; 22 – *E. coli*; 23 – *Pr. Aeruginosa*; 24 – *Lactobacillus spp.*

Таким образом были анализированы 123 штамма бактерии. Незначительное антагонистическое действие было обнаружено только у одного образца, относящегося к виду *Proteus aeruginosa*. Предположительный механизм антибактериального действия может быть связан с нарушением синтеза нуклеиновых кислот.

Антибиотики являются средством установления взаимоотношений между микроорганизмами в сообществе. Известно много бактерий, выделяющих подобные вещества. Самые известные из которых это *Bacillus brevis* синтезирующие антибиотик Грамицидин С, *Bacillus subtilis* –

Бацитрацин, *Bacillus polymyxa* – Полимиксин, *Streptococcus lactis* - Низин и другие.

В данном случае бактерии желудочно-кишечного тракта по нашим данным не вырабатывают антибиотики. Синтез подобных веществ может быть характерен для патогенных бактерий, которым необходимо захватывать свою нишу при попадании в благоприятные условия, но занятые другими бактериями.

В устоявшемся микробиологическом сообществе, каким является микробиота желудочно-кишечного тракта бактериям скорее всего в синтезе подобных веществ нет необходимости или для этого нужен определенный индуктор, сигнализирующий об изменении благоприятных условий. Но тем не менее такие бактерии могут появиться, о чем свидетельствует обнаруженный в другой работе в парадонтальных карманах штамм *Streptococcus parasanguinis*, вырабатывающий антибиотик, действие которого явно связано с нарушением синтеза нуклеиновых кислот (рисунок 15).

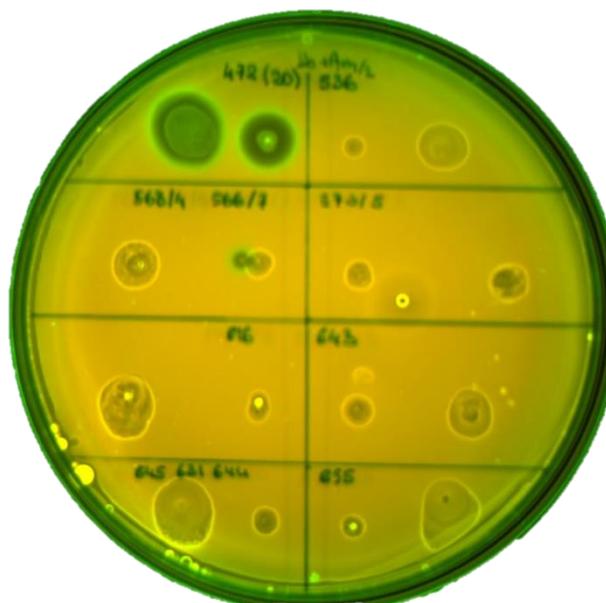


Рисунок 15 – Пример определения бактериальной активности бактериальных штаммов: 1 – *Streptococcus parasanguinis*; 2 – *Staphylococcus capitis*; 3 – *Lactobacillus fermentum*; 4 – *Lactobacillus salivarius*; 5 – *C. Albicans*; 6 – *Streptococcus salivarius*; 7 – *Neisseria* spp; 8 – *Proteus mirabilis*.

## **ВЫВОДЫ**

1. В ходе работы были получены и доведены до чистых культур 123 штамма бактерий кишечной микрофлоры
2. Методом масс-спектрометрии определены таксономические положения полученных штаммов бактерий и выявлено, что они относятся к 44 видам.
3. Среди исследуемых штаммов бактерий выявлен только один образец, проявивший незначительную антибактериальную активность, связанную предположительно с нарушением синтеза нуклеиновых кислот.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

Статья из журнала:

1. Айтбаев, К. А. Ожирение и метаболический синдром: патофизиологическая роль кишечной микробиоты и потенциальные возможности альтернативной терапии / К. А. Айтбаев, И. Т. Муркамилов // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т. 6. – № 3. – С. 120-130
2. Ардатская М.Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника // Медицинский совет. – 2015. – № 13. – С. 95-99.
3. Глушанова Н.А. Масс-спектрометрия идентификация / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Научная электронная библиотека «КиберЛенинка». – 2019. Т. 6. – №3. С.36 – 41.
4. Горелов А. В. – Антибиотики и микробиот / А. В. Горелов, А. В. Карасев // Научный медицинский журнал «Эффективная фармакотерапия» – 2019. – Т.60 - №43. – С. 35- 41.
5. Кайтмазова Н. К. Микробиота кишечника и ее влияние на организм / Н. К. Кайтмазова // Научная электронная библиотека «КиберЛенинка». – 2022. Т. 6. – №3. С.72 – 78.
6. Плотникова, Е. Ю. Метаболический синдром и кишечная микрофлора: что общего? / Е. Ю. Плотникова, О. А. Краснов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – Т. 112. – № 12. – С. 64-73.
7. Ситкин, С. И. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника / С. И. Ситкин, Е. И. Ткаченко, Т. Я. Вахитов // Альманах клинической медицины. – 2015. – № 40. – С. 12–34

## Книги:

1. Беляев, С.А. Микробиология: Учебное пособие / С.А. Беляев. - СПб.: Лань П, 2016. - 496 с.
2. Блинов, Л.Н. Микробиология и иммунология: Учебное пособие / Л.Н. Блинов, И.Л. Перфилова и др. - СПб.: Лань, 2013. - 240 с.
3. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Л.Б. Борисов. - М.: МИА, 2005. - 736 с.
4. Дудун, А. А – Роль кишечной микробиоты в лечении различных заболеваний и антибактериальные препараты нового поколения // А. А. Дудун, А. П. Бонарцев, И. И. Жаркова, В. В. Воинова. – Москва.: – М.: Мир науки, 2020. – 130 с.
5. Емцев, В. Т. Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. - М.: Юрайт, 2020. - 446 с.
6. Кочемасова, З. Н. Микробиология / З.Н. Кочемасова, С.А. Ефремова, Ю.С. Набоков. - Москва: Мир, 2020. - 352 с
7. Левинсон, У. Медицинская микробиология и иммунология / У. Левинсон. - М.: Бином, 2015. - 1181 с.
8. Мартинчик, А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебник / А.Н. Мартинчик. - М.: Academia, 2018. - 480 с.
9. Просеков, А.Ю. Общая биология и микробиология: Учебное пособие / А.Ю. Просеков. - СПб.: Просп. Науки, 2012. - 320 с.
10. Рыбальченко, О Микробиология, вирусология и / О Рыбальченко. - СПб.: Спецлит, 2018. - 81 с.
11. Сбойчаков, В.Б. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований / В.Б. Сбойчаков. - СПб.: Спецлит, 2017. - 608 с.
12. Сидоренко, О.Д. Микробиология: Учебник / О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова, Вой . - М.: Инфра-М, 2017. - 29 с.

13. Фирсов, Н. Н. Микробиология / Н.Н. Фирсов. - М.: Дрофа, 2018. - 256 с.
14. Черкес, Ф.К. Микробиология: Учебник для мед. училищ. / Ф.К. Черкес, Л.Б. Богоявлинская, Бельска . - М.: Альянс, 2014. - 512 с.
15. Arora T., Bäckhed F. The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives // J. Intern. Med. 2016. Vol. 280. №4. P.339–349.
16. Arumugam M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome // Nature. 2011. Vol. 473. №7346. P.174–180.
17. El Aidy S., van den Bogert B. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health // Curr. Opin. Biotechnol. 2015. Vol. 32. P.14–20.
18. Hawrelak J.A., Myers S.P. The causes of intestinal dysbiosis: a review // Altern. Med. Rev. 2004. Vol. 9. №2. P.180–197.
19. Sender R. et al. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body // PLOS Biol. Blackwell Publishing company. 2016. Vol. 14. №8. P.e1002533.
20. Tuohy K., Del Rio D. Diet-microbe interactions in the gut : effects on human health and disease. Elsevier Science. 2014. 268 p.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

## Примеры анализа изолятов на масс-спектрометре

## Autof ms Identification Report

## Basic Information

Sample Name: 601A

Sample Spot: F5

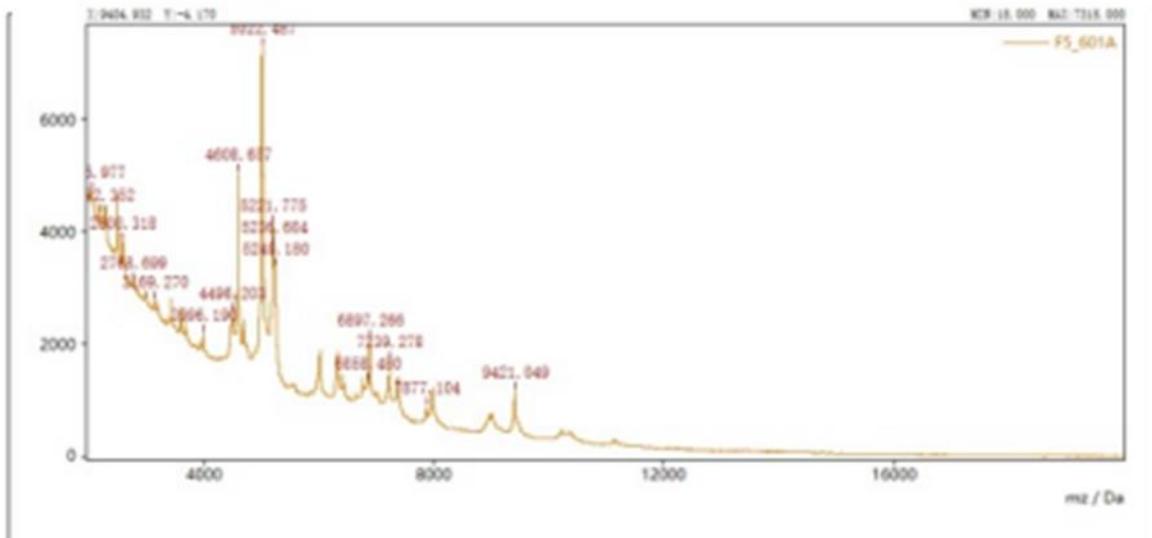
Sample Description:

Operator: Administrator

Generated Time: 10/24/2023 17:41

Identification Result: *Lactobacillus fermentum* 9.033

## Mass Spectrum



## Detailed Results

NO.	Result	Score
1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	9.033
2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	8.807
3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	7.053
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	6.335
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	6.133
6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5.909
7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5.808
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5.756
9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5.584
10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5.410

## Примеры анализа изолятов на масс-спектрметре

## Autof ms Identification Report

## Basic Information

Sample Name:1643 1

Sample Spot:E1

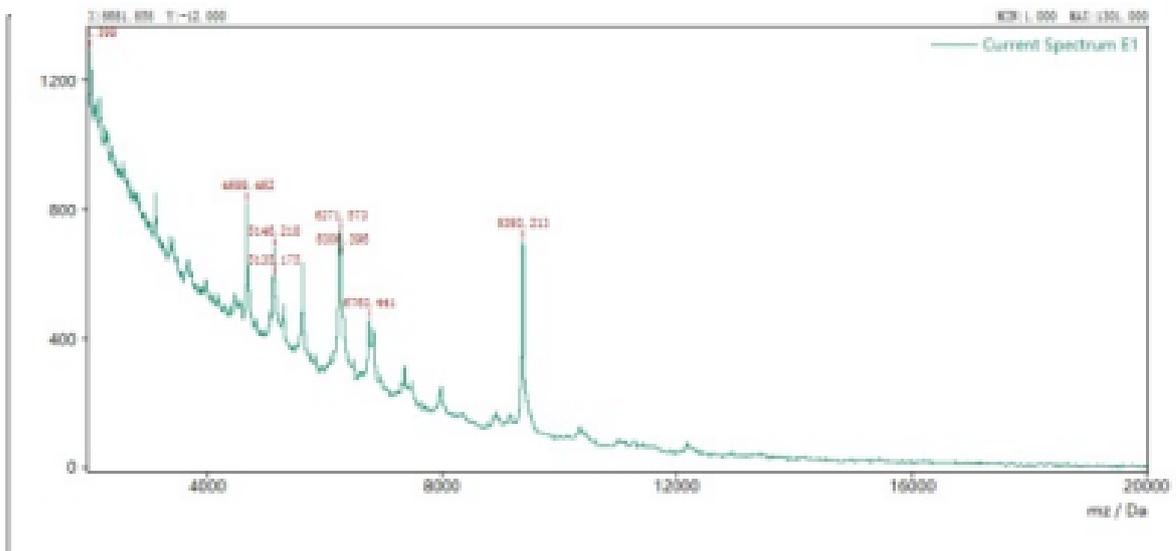
Sample Description:

Operator: Administrator

Generated Time: 05/20/2024 11:08

Identification Result: *Lactobacillus mucosae* 6.421

## Mass Spectrum



## Detailed Results

NO.	Result	Score
1	<i>Lactobacillus mucosae</i>	6.421
2	<i>Lactobacillus mucosae</i>	5.340
3	<i>Aeromonas bestiarum</i>	4.932
4	<i>Lactobacillus mucosae</i>	4.930
5	<i>Deinococcus proteolyticus</i>	4.899
6	<i>Prevotella histicola</i>	4.734
7	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	4.708
8	<i>Vibrio plantisponsor</i>	4.701
9	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	4.691
10	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	4.620

## Примеры анализа изолятов на масс-спектрометре

## Autof ms Identification Report

## Basic Information

Sample Name: 1666

Sample Spot: FB

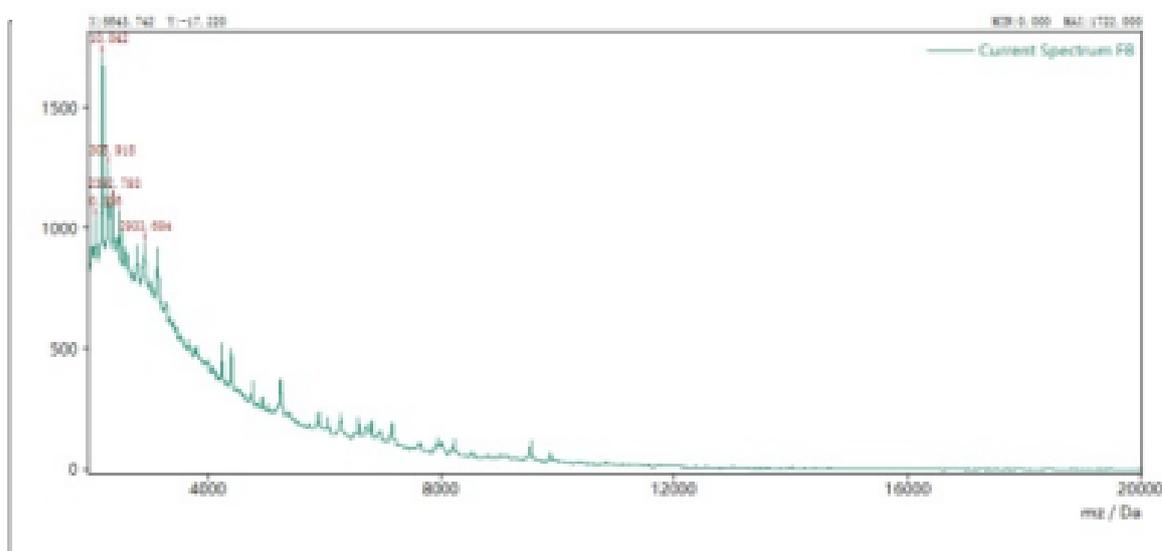
Sample Description:

Operator: Administrator

Generated Time: 05/21/2024 10:54

Identification Result: Streptococcus parasanguinis 6.060

## Mass Spectrum



## Detailed Results

NO.	Result	Score
1	Streptococcus parasanguinis	6.060
2	Streptococcus parasanguinis	5.544
3	Streptococcus parasanguinis	5.456
4	Streptococcus parasanguinis	5.022
5	Granulicatella adiacens	5.021
6	Nocardia ignorata	4.957
7	Streptococcus australis	4.786
8	Thorsellia kenyensis	4.784
9	Streptococcus oralis	4.748
10	Streptococcus koreensis	4.725

## Примеры анализа изолятов на масс-спектрметре

## Autof ms Identification Report

**Basic Information**

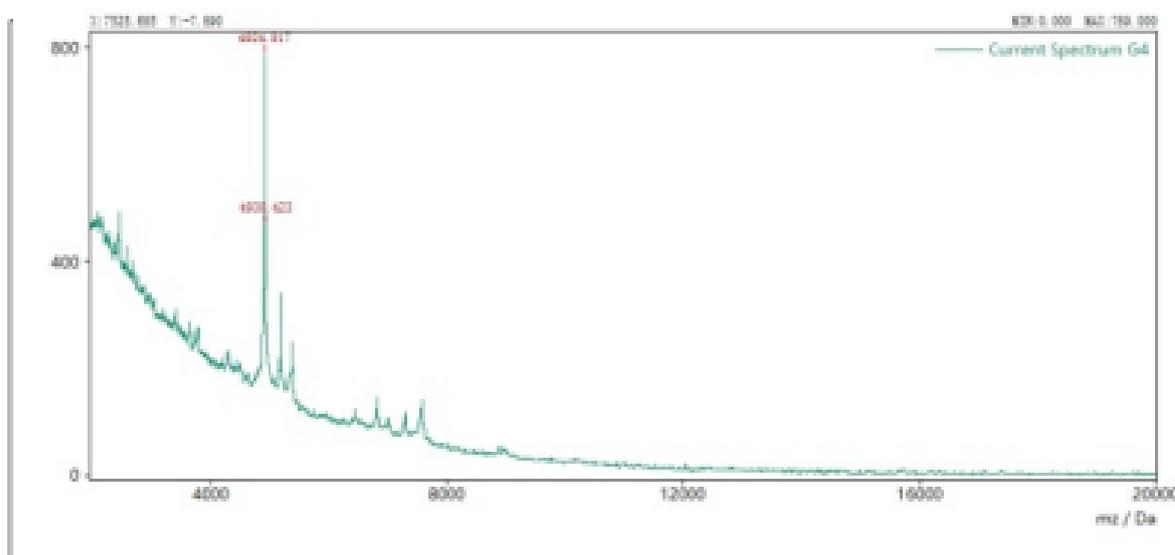
Sample Name: 1667

Sample Spot: G4

Sample Description:

Operator: Administrator

Generated Time: 05/22/2024 12:14

Identification Result: *Lactobacillus salivarius* 6.329**Mass Spectrum****Detailed Results**

NO.	Result	Score
1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	6.329
2	<i>Campylobacter fetus</i>	5.302
3	<i>Lactobacillus aviarius</i>	5.185
4	<i>Lactobacillus salivarius</i>	4.965
5	<i>Candida tropicalis</i>	4.886
6	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	4.877
7	<i>Lactobacillus salivarius</i>	4.804
8	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	4.681
9	<i>Legionella gormanii</i>	4.653
10	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	4.651

## Примеры анализа изолятов на масс-спектрометре

## Autof ms Identification Report

## Basic Information

Sample Name: 1006 en

Sample Spot: A1

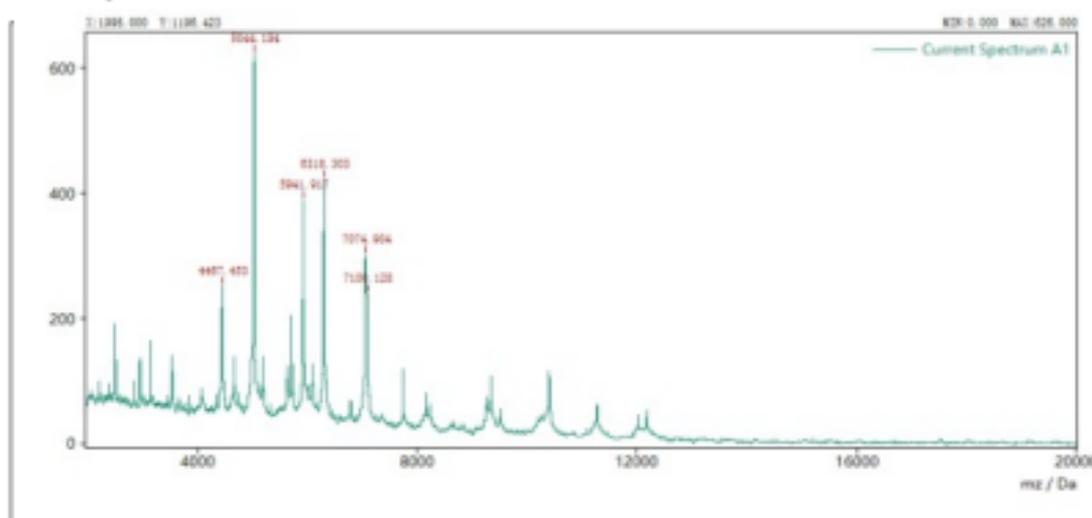
Sample Description:

Operator: Administrator

Generated Time: 12/27/2023 11:59

Identification Result: *Neisseria* sp. 9.109

## Mass Spectrum



## Detailed Results

NO.	Result	Score
1	<i>Neisseria</i> sp.	9.109
2	<i>Neisseria macacae</i>	5.672
3	<i>Neisseria macacae</i>	5.594
4	<i>Neisseria weaveri</i>	4.720
5	<i>Neisseria weaveri</i>	4.705
6	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	4.590
7	<i>Aeromonas veronii</i>	4.577
8	<i>Citrobacter koseri</i>	4.560
9	<i>Ferrimonas</i> sp.	4.523
10	<i>Xenorhabdus eapokensis</i>	4.510



## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Башкирский государственный медицинский  
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.VUZ

Автор работы: Сайфутдинова Г. Р.  
Самоцитирование  
рассчитано для: Сайфутдинова Г. Р.  
Название работы: ИССЛЕДОВАНИЕ ANTIБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА  
Тип работы: Выпускная квалификационная работа  
Подразделение: Башкирский Государственный Медицинский Университет

### РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	8.36%	СОВПАДЕНИЯ	7.89%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	84.26%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	89.01%
ЦИТИРОВАНИЯ	7.38%	ЦИТИРОВАНИЯ	3.1%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

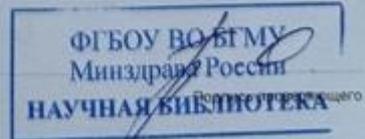
ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 25.06.2024

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 25.06.2024 10:14

Структура документа: Проверенные разделы: приложение с.71-76, библиография с.68-71, титульный лист с.1-2, содержание с.3, основная часть с.4-67  
Модули поиска: Интернет Плюс\*; IEEE; СПС ГАРАНТ: аналитика; ИПС Адилет; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Шаблонные фразы; Перефразирования по коллекции IEEE; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Переводные заимствования\*; Цитирование; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Сводная коллекция ЭБС; Публикации eLIBRARY; Перефразирования по Интернету (EN); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); СМИ России и СНГ; Медицина; Патенты СССР, РФ, СНГ; Кольцо вузов; Публикации РГБ; Переводные заимствования (RuEn); Перефразирования по Интернету; Издательство Wiley; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Переводные заимствования IEEE; Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Переводные заимствования по коллекции

Работу проверил: Баяникова Ольга Сергеевна  
ФИО проверяющего

Дата подписи: 25.06.2024



Чтобы убедиться  
в подлинности справки, используйте QR-код,  
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование  
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.  
Предоставленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.

## ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Обучающийся Сайфутдинова Гульшат Рауфовна группы БМ-201  
*(фамилия, имя, отчество)*

Выпускная квалификационная работа на тему:

Исследование антибактериальных свойств микробиоты кишечника.

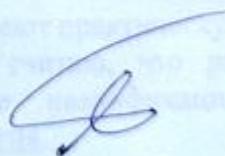
Обучающийся Сайфутдинова Гульшат Рауфовна успешно закончил(а) курс обучения по направлению подготовки 06.04.01. Биология. Итогом обучения явилось выполнение выпускной квалификационной работы, которая является исследовательской работой обучающегося.

При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования и анализа данных источников литературы, а также обобщения полученной информации. В процессе выполнения экспериментальной части были проведены самостоятельные исследования, освоены методы группировки, сравнения, логический, социологических исследований, экономико-математические и другие. Тема раскрыта полно, выводы отражают основные результаты исследования и могут быть использованы в практической деятельности.

В период выполнения выпускной квалификационной работы обучающийся показал(а) себя трудолюбивым, добросовестным исследователем, проявил(а) самостоятельность и творческую инициативу.

Работа отвечает требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, аккуратно оформлена и может быть рекомендована к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология.

Научный руководитель:  
в.н.с. лаборатории биоинженерии  
растений и микроорганизмов  
ИБГ УФИЦ РАН, д.б.н.



Баймиев А.Х.

(подпись)



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

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную-квалификационную работу обучающегося 2 курса по направлению подготовки 06.04.01, Биология (профиль микробиология) Сайфутдиновой Г.Р. на тему «Исследование антибактериальных свойств микробиоты кишечника»

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01, Биология. Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи.

При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, логический, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы.

При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет.

Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований.

Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно.

Результаты проведенной работы имеют практическую значимость.

На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01, Биология.

Рецензент:

Научный сотрудник  
лаборатории биоинженерии растений  
и микроорганизмов  
Института биохимии и генетики  
УФИИ РАН



Владимирова Анастасия Андреевна  
Ученый секретарь  
Бермисева М.А.

Владимирова Анастасия Андреевна

«25» июня 2024г.