

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Кириленко Марина Александровна

**Оценка свойств пробиотических и аутопробиотических штаммов
лактобацилл разными методами**

03.02.03 – Микробиология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
д.б.н., профессор,
Кузнецов Олег Ювенальевич

Иваново 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	6
Цель работы	8
Задачи исследования	8
Научная новизна исследования	9
Теоретическая и практическая значимость	10
Личный вклад автора в проведенное исследование	10
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	11
Степень достоверности и апробация результатов исследования	12
ГЛАВА 1. Обзор литературы	13
1.1. Значение нормальной микробиоты человека для регуляции его гомеостаза	13
1.2. Роль лактобацилл в структуре нормального микробиоценоза кишечника	16
1.3. Формирование биопленки начальных этапов развития бактериальных популяций и возможная роль лактобацилл в образовании биопленки кишечного микробиоценоза	23
1.4. Использование лактобацилл в составе препаратов для коррекции дисбактериозов кишечника (пробиотики, аутопробиотики)	29
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования	45
Штаммы микроорганизмов	45
Микробиологические методы исследования	47
Нефелометрический метод исследования	54
Метод MALDI TOF	55
Получение плодовых тел и сока гриба Шиитаке	59
Статистические методы исследования	61

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
ГЛАВА 3. Культивирование микроорганизмов в различных условиях методом микрокультивирования и чашечным методом	62
3.1. Выбор оптимального информативного показателя для характеристики начальных этапов развития бактериальных популяций в процессе микрокультивирования	62
3.2. Микрокультивирование пробиотических штаммов лактобацилл в оптимальных условиях среды	71
3.3. Микрокультивирование лактобацилл (на примере <i>L.acidophilus</i>) совместно с отдельными видами микроорганизмов микробиоты тела человека	76
3.4. Оценка биосовместимости пробиотического штамма <i>L.acidophilus</i> и лактобацилл, содержащихся в функциональных продуктах питания методом микрокультивирования	79
3.5. Использование метода микрокультивирования при оценке воздействия природных активных веществ на пробиотические штаммы лактобацилл	81
3.6. Оценка биосовместимости лактобацилл (на примере <i>L.acidophilus</i>) с отдельными представителями микробиоты кишечника	84
3.7. Оценка антагонизма лактобацилл (на примере <i>L.acidophilus</i>) с отдельными представителями микробиоты кишечника	87
ГЛАВА 4. Воздействие антимикробных факторов врожденного иммунитета на отдельные виды микроорганизмов микробиоты тела человека	92
4.1. Использование метода микрокультивирования в оценке влияния антимикробных факторов защиты слюны на некоторые пробиотические штаммы лактобацилл	92

4.2. Адаптивное поведение популяций различных видов микроорганизмов под воздействием антимикробных факторов защиты слюны	96
4.3. Оценка влияния антимикробных факторов защиты слюны нефелометрическим методом анализа между чужими и родственными людьми на лактобациллы	105
ГЛАВА 5. Исследование свойств аутопробиотического комплекса лактобацилл in vitro	113
5.1. Получение аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл	113
5.2. Метод MALDI TOF как референсный метод для оценки чистоты аутопробиотических комплексов лактобацилл	117
5.3. Определение степени биологического сродства аутопробиотических комплексов у близких родственников разного возраста	123
5.4. Масштабирование процесса приготовления молочнокислого аутопробиотического продукта	126
5.5. Влияние натуральных биологически активных веществ лекарственного гриба Шиитакэ (<i>Lentinus edodes</i>) на развитие лактобацилл аутопробиотического комплекса	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
ВЫВОДЫ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	154
Приложения	171-180

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Организм человека содержит триллионы микроорганизмов, общее количество которых более чем в 10 раз превышает число его собственных клеток, при этом общая масса всей микробиоты человека составляет от 1 до 3% массы его тела. Видовое разнообразие микробиоты измеряется четырехзначным числом (более 1000 видов), а совокупное количество ее генов (микробиом) - семизначным (около 3,3 млн. генов), превышая по численности геном человека в 150 раз [92]. Среди биотопов человека кишечник имеет особое значение, поскольку около 70% микроорганизмов, населяющих организм человека, обитают в толстой кишке, которая выполняет важнейшие функции, такие как адсорбция, секреция электролитов и воды, поддержание гомеостаза и многие другие [116].

Проблемы становления, формирования и функционирования нормальной микробиоты человека, а также возможности ее восстановления после нарушений различной степени тяжести, издавна являются важными в микробиологических исследованиях. Эта микробиота чрезвычайно важна для сохранения гомеостаза организма, повышения устойчивости во внешней среде. Все это достигается как за счет антагонистической функции нормальной микробиоты по отношению к патогенам, так и опосредованно через включение механизмов иммунной системы. [38, 59].

Особую роль в поддержании гомеостаза организма играет нормальная микробиота кишечника. Это одна из наиболее заселенных экологических ниш макроорганизма, где, по различным данным, живет от 200 до 500 различных видов микроорганизмов. Одной из наиболее значимых групп микроорганизмов кишечника являются лактобациллы, широко используемые в качестве пробиотических препаратов для коррекции дисбактериозов человека [112, 135].

Лактобациллы и их роль, а также использование, особенно для коррекции дисбактериозов кишечника человека, являются одной из наиболее

обсуждаемых проблем при оценке значимости микробиоты макроорганизмов. В последние годы появилось много новых лекарственных препаратов с различными штаммами лактобацилл. Вместе с тем отмечается, несмотря на высокий терапевтический эффект, последующая элиминация из кишечника внесенных лактобацилл, входящих в состав примененного препарата. Причины и механизмы данного явления до настоящего времени не вполне расшифрованы [10].

Как известно, исследование бактериальной популяции возможно на трех уровнях организации биологической системы: клеточном, клеточно-популяционном и популяционном.

На клеточном уровне изучаются отдельные клетки, их морфофизиологические особенности роста и развития в различных условиях среды культивирования [133].

На клеточно-популяционном уровне учитывается гетерогенность клеточной популяции по различным свойствам составляющих популяции клеток, а также причины возникновения этой гетерогенности.

На популяционном уровне изучается динамика поведения микробных популяций в целом и особенности взаимодействия популяций микроорганизмов между собой при совместном культивировании [143].

Степень разработанности темы исследования

За последние десятилетие достигнуты значительные успехи в разработке и применении пробиотических продуктов и препаратов на основе лактобацилл. Однако с расширением спектра показаний для назначения пробиотиков стала накапливаться информация, что положительный эффект даже при длительном применении нередко носит временный характер или полностью отсутствует. Появились отдельные сообщения о возникновении у лиц, длительно принимающих живые пробиотические микроорганизмы, различных осложнений [110, 139]. Разработка новых пробиотиков активно продолжается, и исследования в этом направлении являются

перспективными для обеспечения человека новыми биологическими препаратами. [123].

Одной из главных причин неэффективности пробиотиков является чужеродность для человека входящих в их состав микроорганизмов. Клинико–экспериментальные работы по коррекции дисбактериозов показали, что лучший эффект достигается либо при индивидуальном подборе донорских штаммов, либо при использовании собственной микробиоты [87]. Длительное использование аутоштаммов лактобацилл позволяет достигать максимального эффекта при восстановлении нормальной микробиоты кишечника. Создание общедоступных технологий выделения аутоштаммов лактобацилл для получения молочнокислых продуктов индивидуального получения крайне важно для устранения микрoэкологических нарушений кишечника.

Отечественными исследователями предложен способ получения аутопробиотиков, содержащих живые бифидобактерии и лактобациллы [47]. Недостатками данного способа было использование всего по одному штамму выделенных отдельно бифидобактерий и лактобацилл из всего многообразия видов этих индигенных микроорганизмов (до 5 видов бифидобактерий и более 10 видов лактобацилл). Кроме того, при данном способе выделения аутоштаммов велика вероятность того, что выделенные культуры являются клонами чужеродных для хозяина микроорганизмов, случайно попавших в пищеварительный тракт с пищей и водой, а также возможность случайного отбора среди культур лактобацилл и бифидобактерий не самых активных в антагонистическом отношении штаммов.

В последние годы перспективным направлением является разработка новых технологий выделения аутопробиотиков на основе естественного комплексного микробиоценоза бифидобактерий и лактобацилл толстой кишки человека. Полученный аутопробиотик может быть использован для коррекции дисбактериоза и заболеваний, связанных с нарушениями

нормальной микробиоты кишечника у человека [47]. Поэтому создание общедоступных технологий выделения аутоштаммов лактобацилл для получения пробиотиков индивидуального потребления крайне важно для устранения микрoэкологических нарушений кишечника и требует дальнейшего изучения.

Несмотря на широкое и успешное использование лактобацилл для коррекции дисбактериоза кишечника [4, 46, 71], морфофункциональные особенности взаимодействия их со средой обитания, особенно на ранних стадиях образования колоний, изучены слабо. Однако изучение начальных стадий образования колоний (до этапа формирования устойчивой биопленки) чрезвычайно важно, поскольку здесь может быть получен новый материал для понимания процессов закрепления, функционирования и устойчивости лактобацилл в составе микробиоценоза кишечника. Вместе с тем исследования клеточного и клеточно-популяционного уровней протекания биологических процессов, несомненно, даст основу для понимания популяционных взаимодействий лактобацилл и другой микробиоты в сложной структуре микробиоценоза кишечника при культивировании в различных условиях.

Цель работы: оценить свойства аутопробиотического комплекса лактобацилл с использованием различных методов исследования бактерий.

Для достижения выше указанной цели были поставлены следующие задачи:

Задачи исследования:

1. Определить наиболее информативный физиологический показатель состояния клеток лактобацилл на различных уровнях развития (клеточном, видовом и популяционном).

2. Установить межвидовую биосовместимость лактобацилл и оценить влияние условно-патогенной микробиоты на представителей рода *Lactobacillus*.

3. Оценить действие природных биологически активных веществ на различные штаммы лактобацилл.

4. Изучить влияние иммунных факторов слюны на клетки лактобацилл *in vitro*.

5. Разработать способ выделения аутоштаммов лактобацилл, выбрать методы оценки степени чистоты и сохранения жизнеспособности культур полученного аутопробиотического комплекса для контроля его качества.

6. Сравнить аутопробиотические комплексы кишечника родственников разного возраста для их возможного использования внутри семейной группы.

Научная новизна исследования

Установлен физиологический показатель, позволяющий охарактеризовать состояние популяции лактобацилл на клеточном уровне - время генерации для первого и второго поколений клеток. Наиболее информативным показателем оказалось время размножения клеток лактобацилл второго поколения, в котором зафиксирован жизненный цикл отдельной клетки.

Показано, что пробиотические штаммы лактобацилл обладали различным спектром антагонистической активности как в отношении друг друга, так и в отношении штаммов условно-патогенной микробиоты кишечника человека. Информация о биосовместимости культур необходима при конструировании новых биопрепаратов (про- и симбиотиков) для коррекции дисбиотических нарушений кишечной микробиоты.

Выявлено, что пробиотические лактобациллы, обладавшие антагонистической активностью, идентичны у генетически близких родственников.

Впервые установлено, что биологически активные вещества сока и порошка гриба Шиитаке на 40 - 75% стимулируют рост лактобацилл.

На основании полученных данных при изучении свойств лактобацилл разными методами разработан новый аутопробиотический комплекс (АПК). Доказано, что лактобациллы аутопробиотического комплекса при минус

20 °С в условиях длительного хранения (24 месяца) не снижали жизнеспособность.

Теоретическая и практическая значимость

Изучены биологические особенности развития лактобацилл при различных (оптимальных и экстремальных) условиях культивирования.

Получены данные о межвидовых взаимоотношениях лактобацилл на клеточном и популяционном уровнях, расширяющие представления об их симбиотических взаимодействиях с условно-патогенными микроорганизмами и нормальной микробиотой кишечника человека, что явились основой разработки аутопробиотического комплекса.

Установлена длительность хранения лактобацилл без потери их жизнеспособности и активности на протяжении не менее двух лет в условиях низкой температуры (минус 20 °С). Это в перспективе может стать основой для создания криобанка аутоштаммов при получении продуктов индивидуального потребления.

Показана перспективность использования натуральных биологически активных компонентов гриба Шиитаке для стимуляции роста лактобацилл в пробиотических препаратах и аутопробиотических комплексах.

По результатам проведенных исследований получены патенты РФ «Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы» 2014 г. и «Способ получения препарата эубиотика Лактобактерин с добавлением сока или порошка гриба Шиитаке» 2018 г.

На основании полученных данных издано и используется в курсе лекций учебное пособие для студентов «Дисбактериоз кишечника. Причины, симптомы, современная диагностика и эффективное лечение», 2016 г.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея и планирование научной работы, формулировка цели и задач, определение методологии и

общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем д.б.н. Кузнецовым О.Ю. Лично автором выполнены микробиологические и нефелометрические исследования, а также анализ полученных масс-спектров методом MALDI TOF. Данные, полученные в ходе выполнения работы, статистически обработаны и проанализированы автором.

Методология и методы исследования

Объектами исследования являлись пробиотические и аутопробиотические штаммы лактобацилл.

Предметом исследования были физиологические свойства разных лактобацилл и оригинального аутопробиотического комплекса (показатели размножения, антагонизм, биосовместимость и др.).

Теоретической основой исследований стали литературные сведения о фундаментальных и прикладных разработках в области микробиологии и микроэкологии.

Методологической основой работы являлись бактериологические методы (культивирование, микрокультивирование, тестирование на антагонизм), инструментальные методы исследования (нефелометрия, MALDI TOF), статистический анализ и другие специальные методы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Время деления клеток второго поколения, установленное методом микрокультивирования, характеризует физиологическое состояние лактобацилл в норме и при измененных условиях выращивания, а также под влиянием других бактериальных культур на клеточном и популяционном уровнях.
2. Разработанный способ выделения, накопления и хранения комплекса лактобацилл служит основой для получения пробиотика индивидуального потребления, предназначенного для восстановления микробиоценоза человека.
3. Метод MALDI TOF может быть использован для быстрого определения чистоты выделенного АПК (отсутствие посторонних

бактериальных контаминантов) при исследовании групп близких родственников: детей и взрослых.

4. Биологически активные вещества (сок и порошок) гриба Шиитакэ стимулируют рост лактобацилл при культивировании пробиотических штаммов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность научных положений и выводов, представленных в работе, подтверждается применением широкого спектра сертифицированных микробиологических методов, характеризующихся высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью, а также адекватным статистическим анализом полученных данных.

Результаты проведенных исследований доложены на 92-ой ежегодной научно - практической конференции студентов и молодых ученых «Неделя науки», посвященной 110-летию со дня рождения профессора С.Д. Носова (г. Иваново, 2012); Молодежном научно-инновационном конкурсе «УМНИК 2013», I этап (г. Иваново, 2013); II этап (г. Ярославль 2013).

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании кафедр микробиологии и вирусологии с другими кафедрами ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России (протокол № 2 от 28 апреля 2021 г.).

Объем и структура диссертации

Текст диссертации изложен на 180 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, содержащих описание объектов и методов исследования, заключения, выводов, списка сокращений и библиографического указателя, включающего 80 работ отечественных и 76 работ зарубежных источников. Работа иллюстрирована 15 рисунками и 17 таблицами.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Значение нормальной микробиоты человека для регуляции его гомеостаза

В процессе многовековой эволюции при взаимодействии с миром микробов человеческий организм отобрал полезные для своей жизнедеятельности микроорганизмы. Пристальное внимание к изучению микроорганизмов, обнаруживаемых у человека, показало целесообразность выделения облигатной (постоянной), факультативной (добавочной) и транзиторной (случайной) групп микробов. Соответственно, частота обнаружения и обсемененность биотопов представителями постоянной микробиоты отличались самыми высокими цифровыми показателями и нуждаемостью в них при дефиците для функционирования органов и систем [73].

Нормальная микробиота – это качественное и количественное соотношение разнообразных микробов отдельных органов и систем, поддерживающее биохимическое, метаболическое и иммунное равновесие макроорганизма, необходимое для сохранения здоровья человека [58]. В целом, это эволюционно сложившаяся экологическая система симбиотических микроорганизмов, населяющих открытые полости человека и поддерживающих метаболическое, биохимическое и иммунологическое равновесие, необходимое для здоровья человека.

Одним из самых важных микробиоценозов тела человека в его онтогенезе является микробиоценоз кишечника, поскольку именно он первоначально с момента рождения массово заселяется микроорганизмами, поступающими вместе с пищей. Доминирующей группой, характерной для эубиоза здоровых взрослых людей, являются анаэробные бактерии, на долю которых приходится до 90-98% от общего количества микроорганизмов кишечника [12].

Данные микроорганизмы осваивают пищу внутри кишечника, создавая защитную биопленку в пристеночной области и накапливаясь в его просвете в больших концентрациях до 10^{12} микробов. Именно данная микробиота на первых этапах становления гомеостаза организма выполняет защитные и трофические функции, нарушение которых ведет к возникновению различных заболеваний.

Микробиота кишечника, приобретенная на ранних этапах жизни, так глубоко влияет на морфологический и физиологический статус своего хозяина, что многие характеристики организма, которые кажутся наследственными, в действительности определяются микробиотой. От микробиоты кишечника зависит первоначальный темп роста молодого организма, потребность в питании, резистентность к инфекциям и другим неблагоприятным воздействиям.

Нормальная кишечная микробиота представляет собой один из самых определяющих факторов, выполняющих важные физиологические и иммунологические функции в организме, составляя с ним единое целое. Влияние нормальной микробиоты кишечного тракта на здоровье известно давно, и характер микроэкологии кишечника может служить чувствительным критерием оценки общего состояния организма.

Молочнокислые бактерии являются важной составляющей нормальной микробиоты пищеварительного тракта человека [104]. Подтверждением значимости роли лактобацилл в составе микробиоты кишечника является тот факт, что задолго до начала масштабного изучения микробиоты человека и определения ее роли в формировании стабильности всех микробиоценозов тела человека и в конечном счете состоянии его здоровья. Давно известно, что кисломолочные продукты не только усваиваются лучше пресного молока, но и препятствуют развитию нарушений пищеварения. Кроме того, достоверно установлено, что при использовании лактобацилл для коррекции микробиоты кишечника человека существенно ускоряются процессы выздоровления после ряда инфекционных заболеваний.

Все это привело к созданию и широкому развитию современной нутрициологии (науке о питании). В последние годы достижения данной науки послужили основой для разработки нового направления в пищевой индустрии – создания пробиотических продуктов для профилактики и их использования для лечения определенных заболеваний [63].

Под пробиотическими продуктами понимают живые микроорганизмы, которые благоприятно влияют на организм человека, способствуя формированию полноценного барьера слизистой оболочки кишечника, препятствующего адгезии патогенов, модуляции защитных механизмов организма, улучшению баланса кишечной микробиоты. Доказано, что они (микроорганизмы) положительно влияют на формирование неиммуногенного защитного барьера кишечника, создающего конкуренцию с другими бактериями за эпителиальные рецепторы и пищевые субстраты, синтез антимикробных факторов, а также ацидификацию химуса, стимуляцию выработки муцина и регенерацию эпителия [107].

Особое место в процессе формирования и функционирования иммунной системы отводится облигатной микробиоте кишечника. Существует точка зрения, что для полного созревания кишечника, лимфоидная ткань которого является частью иммунной системы, необходимо воздействие не только и не столько антигенов пищи, сколько антигенов нормальной микробиоты. Бактерии-комменсалы определяют дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов с образованием регуляторных Т-лимфоцитов стенке кишечника, в пейеровых бляшках кишечника [94, 131].

Причем ключевую роль в данном процессе играют именно лактобациллы, поскольку заселение ими организма человека при вагинальных родах, но не при кесаревом сечении происходит с первых дней жизни с последующим постоянным присутствием в составе некоторых других микробиоценозов и, в первую очередь, микробиоценоза кишечника.

Лактобациллы обитают во всех отделах пищеварительного тракта от ротовой полости до толстой кишки (10^6 – 10^{11} КОЕ/г), где они составляют

превалирующую часть микробиоты. В процессе нормального метаболизма они способны образовывать молочную кислоту, перекись водорода, продуцировать лизоцим и другие вещества с антибактериальной активностью, в целом являясь основным микробиологическим звеном формирования колонизационной резистентности и обуславливая антагонистическую активность, что может быть использовано в практике в качестве этиотропной терапии.

Согласно литературным данным [79], антагонистическое действие, обусловленное конкурентной борьбой лактобацилл за сайты прикрепления, играет существенную роль в отношении адгезии, например, ротавирусов. Некоторые штаммы лактобацилл способствуют более быстрой ликвидации дисахаридазной недостаточности, что особенно важно для больных ротавирусным гастроэнтеритом.

В последние годы доказано прямое участие лактобацилл в иммунных реакциях. Взаимодействие лактобацилл с макрофагами стимулирует продукцию интерлейкинов, влияющих на показатели клеточного иммунитета [93].

Учитывая столь большую значимость лактобацилл в процессах стабилизации микробиоты кишечника, важно определить их роль в структуре микробиоценоза, особенности их развития и функционирования в процессах жизнедеятельности для сохранения гомеостаза макроорганизма.

1.2. Роль лактобацилл в структуре нормального микробиоценоза кишечника

Значительную роль в поддержании нормального биоценоза в кишечнике отводится лактобактериям и бифидобактериям, которые, по мнению большинства исследователей, присутствуют практически во всех отделах кишечника [119]. И бифидобактерии, и лактобациллы вместе с другими молочнокислыми микробами имеют исключительно большое значение для поддержания состояния здоровья.

Лактобациллы в сочетании с бифидобактериями составляют основное звено микробиоты кишечника. В толстом кишечнике наиболее часто встречаются различные виды лактобацилл: *L.brevis* (28%), *L.plantarum* (19%), *L.acidophilus* (12%), *L.cellobiosus* (9,5%), *L.casei* (9,5%) – которые образуют всевозможные сочетания [3], выполняющие, видимо, совместно одни и те же функции.

Лактобациллы обладают выраженной антагонистической активностью и способностью к адгезии, этим обуславливают важную роль микроорганизмов в поддержании колонизационной резистентности. Благодаря этим свойствам, лактобациллы подавляют рост и размножение поступающих извне представителей посторонней микробиоты. Они предотвращают приживание последних, закрывая рецепторы клеток слизистых от адгезинов потенциально патогенных бактерий.

В 2000 году на модели гнотобиологических мышей, предварительно инфицированных лактобациллами, было показано, что эти микроорганизмы предотвращали колонизацию животных *Helicobacter pylori*, возбудителя язвенной болезни человека и животных. Имеются хорошо документированные факты, что лактобациллы, в частности *Lactobacillus GG*, обладают выраженной способностью предотвращать обострение язвенного колита, вызываемого *C.difficile* [126].

Известно, что представители рода лактобациллы способны синтезировать антимикробные вещества, ассоциированные с синтезом бактериоцинов. В отличие от антибиотиков бактериоцины имеют сравнительно узкий спектр действия против родственных видов. В процессе нормального метаболизма они способны образовывать молочную кислоту, перекись водорода, продуцировать лизоцим, реутерин, плантарицин, лактоцидин, лактолин, комплекс этих веществ, защищающий организм человека от различных инфекций [113].

Лактобациллы (*L.acidophilus (helveticus TIII) NK 1*) показали большую антагонистическую активность в отношении грамположительных бактерий,

особенно *B.subtilis*, зона задержки роста составила 80 мм, такая же высокая активность отмечена по отношению к грамотрицательным *Shigella sonnei* и *Pseudomonas aeruginosa*. Высокий антагонизм проявляется против *E.coli* и *Klebsiella pneumoniae*, зона задержки роста составляла 36-50 мм. В отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida* исследуемые лактобациллы были неактивны [72].

Недостаток молочнокислых бактерий в кишечном тракте человека может привести к серьезным нарушениям в его работе. Нарушения нормальной микробиоты относятся к дисбактериозам. Согласно положению отраслевого стандарта дисбактериоз кишечника, это клиничко-лабораторный синдром, возникающий при целом ряде заболеваний и клинических ситуаций, который характеризуется изменением качественного и/или количественного состава нормофлоры определенного биотопа, а также транслокацией различных ее представителей в несвойственные биотопы, метаболическими и иммунными нарушениями, сопровождающимися клиническими симптомами у части пациентов [54].

С учетом того, что частота распространения дисбактериоза в популяции россиян достигла 90%, становится очевидным, насколько важно приостановить дальнейшее разрушение микрoэкологического статуса жителей нашей страны. В 21 веке наиболее изученным, в определенной степени практически реализованным направлением поддержания микробной экологии человека и животных на оптимальном уровне является использование для этих целей микробных препаратов на основе живых микроорганизмов преимущественно представителей нормальной микробиоты пищеварительного тракта человека и в меньшей степени выделенных из объектов окружающей среды и продуктов питания. В последние годы в практику начинают внедряться пробиотики, действующим началом которых являются штаммы нормальной микробиоты, а именно лактобациллы и бифидобактерии, изолированные от конкретного индивидуума и предназначенные для коррекции его микрoэкологии [73].

Пробиотики служат основным физиологическим средством подавления чрезмерного размножения условно-патогенных микроорганизмов, а также коррекции численности в отдельных бактериозах. Реже пробиотики используются в качестве альтернативы антибактериальным средствам при антибиотикоустойчивости возбудителя, для лечения беременных и детей, а также больных с аллергией к антибиотикам. Пробиотические бактериальные препараты с высокой антагонистической активностью в ряде случаев применяются для лечения местных гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений, открытых и послеоперационных ран, ожогов [100, 128].

Среди лактобацилл виду *L.acidophilus* принадлежит ведущая роль как среди молочнокислых лечебно-диагностических продуктов, так и фармакопейных биопрепаратов. Любые проявления дисбактериоза у человека обязательно затрагивают данный вид лактобацилл. Столь большое внимание биотехнологов и микробиологов к ацидофильным лактобактериям обусловлено тем, что представители данного вида не участвуют в возникновении каких-либо патологических процессов в организме человека. С другой стороны, обнаруживаются все новые стороны их позитивного воздействия на физическое и психическое здоровье человека.

Ацидофильные лактобациллы в виде живых или убитых бактерий, аутолизатов, бесклеточных продуктов метаболизма, экстрактов и других форм широко используются для профилактики и лечения больных с различными острыми и хроническими заболеваниями пищеварительного тракта, воспалительными процессами дыхательных путей, бактериальными инфекциями мочеполовой системы. Представителей этого вида лактобацилл применяют так же, как антиоксиданты и средства, понижающие липидную пероксидазу и стимулирующие рост нормальной микробиоты кишечника.

Эти микроорганизмы обладают противоопухолевой активностью и стимулируют различные звенья иммунитета. Достаточно отметить, что оральное назначение *L. acidophilus* более чем в четыре раза увеличивает секреторный IgA. Оральная бактериальная терапия ацидофильными

лактобациллами предотвращает возникновение у детей диарей, связанных с назначением им антибиотиков [90].

Есть указания, что добавление к молоку казитона (0,5 %) и фруктозы (0,5 %) заметно усиливает количество жизнеспособных ацидофильных лактобацилл, увеличивает скорость утилизации углеводов, укорачивает время генерации этих бактерий, кроме того, вдвое увеличивает количество жизнеспособных лактобацилл после 21 суток хранения кисломолочного продукта [130].

В исследованиях *in vitro* показано, что штамм *L.acidophilus* La1 вырабатывает соединения с антимикробной активностью, которые снижают жизнеспособность *Helicobacter pylori* [96]. Штамм *L.rhamnosus* GG продуцирует вещество, вызывающее ингибирующий эффект на ряд грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [83].

Установлено, что штамм *L.casei rhamnosus* Lcr35 не только синтезирует вещества с антимикробной активностью, но и в экспериментах *in vitro* препятствует адгезии некоторых энтеропатогенов человека к эпителиоцитам кишечника [123].

В экспериментах показано, что штаммы *L.gasseri* OLL2716 (LG21) и *L.acidophilus (johnsonii)* La1 снижали содержание ¹³C в выдыхаемом воздухе, определяемом при проведении дыхательных уреазных тестов, уменьшали активность воспаления слизистой оболочки желудка (штамм LG21), однако исследование биопсийного материала (штамм La1) не подтверждало эрадикацию *H.pylori* [134]. В то же время в других исследованиях продемонстрирована более высокая частота эрадикации *H.pylori* у пациентов, получавших пробиотики, содержащие *L.acidophilus* [108].

Пробиотические штаммы различных микроорганизмов неоднократно исследовались с целью установления возможностей их использования для профилактики и лечения инфекционных диарей, вызванных энтеропатогенными микроорганизмами, такими как энтеротоксигенные штаммы: *E.coli*, *Shigella spp.* и *Salmonella spp.* Эти возбудители являются

основными этиологическими агентами острых диарей у туристов. На их долю приходится около 80% от числа всех случаев диарей с установленной этиологией [97].

Проведены *in vitro* исследования способности некоторых штаммов предотвращать колонизацию кишечника патогенными бактериями. Так, на культуре клеток кишечного эпителия Caco-2 штамм *L.casei rhamnosus Lcr 35* предотвращал колонизацию различными энтеропатогенами [123].

Francesco Savino с коллегами было установлено, что в кишечной микробиоте у детей, страдающих коликами, в гораздо меньшем количестве содержатся лактобациллы и более часто анаэробные грамотрицательные микроорганизмы. В течение 7 дней назначения 100 млн. живых бактерий *L.reuteri* в их рандомизированном слепом проспективном исследовании значительно снижались симптомы проявления колик у 95% младенцев по сравнению с группой детей, где только 7% ответили на терапию 60 мг/сутки симетикона ($p < 0,01$) [114].

Лактобациллы способны утилизировать флавопротеины, которые преобразуют кислород в перекись водорода. Это приводит к образованию перекиси в количестве, превышающем способность ее деградировать. Данное химическое соединение, продуцируемое лактобактериями, вызывает истощение ферментативной системы каталазозависящих микроорганизмов, оказывает действие на каталазоположительную микробиоту, вызывает снижение синтеза белка, ограничивает передачу генетической информации.

Лактобациллы, наиболее часто встречающиеся в микрофлоре человека, обладают устойчивостью к действию лизоцима, а некоторые штаммы *L.fermentum* даже продуцируют лизоцим, что в сочетании с лизоцимом слизистой оболочки кишечника способствует устойчивости последней к действию патогенной микробиоты [11].

Имеются сведения о способности лактобацилл к влиянию на систему иммунитета, которое проявляется в стимуляции фагоцитарной активности

нейтрофилов, макрофагов, синтеза иммуноглобулинов, образовании интерферонов, интерлейкинов и некроза опухолей [102].

Показано, что уровень иммунитета (секретируемых антител при ротавирусной инфекции) у детей существенно выше при использовании живых *L.casei GG* по сравнению с убитой нагреванием культурой этих же микроорганизмов. Представители рода лактобациллы стимулируют подавленную иммунную систему и не влияют на иммунную систему, находящуюся в нормальном состоянии, т.е. лактобациллы выполняют скорее не иммуностимулирующие, а иммуномодулирующие функции. При нормальном микробиоценозе влагалища, кишечника и ротовой полости не изменяют параметры иммунограммы [103].

Молочнокислые палочки принимают участие в колонизационной резистентности. Они обладают способностью блокировать рецепторы клеток слизистых оболочек макроорганизма, препятствуя адгезии патогенных микроорганизмов.

Учитывая полифакториальность антимикробной активности лактобацилл, можно определить спектр их антагонистического воздействия, в основном ориентируясь на действия бактериоцинов, которые научились выделять, синтезировать, исследовать как антибиотики, на способность подавлять размножение микроорганизмов, определять их минимальную ингибирующую концентрацию или зоны подавления роста [44].

Лактобациллы проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении широко круга аэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых облигатно – анаэробных микроорганизмов. Наиболее выражена эта активность у представителей видов *L.acidophilus*, *L.plantarum*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L.buchnei* [74].

Доказано существование лактобацилл, обладающих избирательным антимикотическим действием. Бензойная, мевалоновая кислоты и метилгедантоин, выделяющиеся в ходе метаболизма *L.plantarum*, ингибируют рост грамположительных бактерий. Клетки *L.reuteri*,

продуцирующие резтерин, оказывают более выраженный эффект на грамположительные бактерии и грибы [22].

Антагонистический механизм воздействия лактобацилл связан с тем, что они обладают протеолитической (за счет продуцирования внутри- и внеклеточных протеаз) и липолитической (расщепление жиров молока и некоторых триглицеридов) активностью. Безусловно, также оказывает влияние механизм, свойственный всем микроорганизмам, – конкурентная борьба за эпитопы прикрепления и продукты питания.

Имеет значение способность продуктов их жизнедеятельности создавать кислую среду, образовывать антибактериальные компоненты, препятствующие адгезии патогенных микроорганизмов [6, 80].

Этиотропный эффект действия лактобацилл также связан с их способностью образовывать на поверхности слизистой оболочки кишки защитную биопленку, препятствующую транслокации чужеродных микроорганизмов. В связи с этим представляется очень важным и значимым рассмотрение вопросов, связанных с образованием, закреплением и функционированием биопленки лактобацилл непосредственно с самых ранних этапов ее формирования.

1.3. Формирование биопленки начальных этапов развития бактериальных популяций и возможная роль лактобацилл в образовании биопленки кишечного микробиоценоза

В настоящее время наблюдается переход от традиционного представления о бактериях как строго одноклеточных организмах к представлению о микробных сообществах как целостных структурах, регулирующих свои поведенческие реакции в зависимости от изменения условий обитания. Колонии практически всех видов бактерий демонстрируют способность к клеточной дифференцировке и многоклеточной организации. Эта способность наиболее очевидно проявляется при росте бактерий в их природных местах обитания, где они формируют различные многоклеточные структуры: биопленки,

бактериальные маты, плодовые тела и другие, сложно устроенные пространственные структуры [125].

Вплоть до конца прошлого века микробиология развивалась главным образом на основе исследований чистых культур микроорганизмов. В конце XX века сформировалось представление об особой форме организации микробиоты организма человека — хорошо организованном взаимодействующем сообществе микроорганизмов, покрывающих поверхности кишечной стенки, других слизистых оболочек, кожи и зубов человека.

На сегодняшний день известно, что большинство бактерий существуют в природе не в виде свободно плавающих клеток, а в виде специфически организованных биопленок. Причем сами бактерии составляют лишь 5-35% массы биопленки, остальная часть — это межбактериальный матрикс. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. микробиота биопленки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы по сравнению со свободно плавающими бактериями — они оказались очень устойчивы к воздействию ультрафиолетового излучения, дегидратации и вирусам, антибиотикам и факторам иммунной защиты [98].

Фактором устойчивости биопленок оказывается слизисто-полимерный слой, вырабатываемый сразу после адгезии и включающий липополисахариды, протеогликаны, гликопротеиды, эндополисахариды, аналогичные веществу клеточной стенки, гликокаликса и капсул бактерий. Многочисленные физиологические процессы, происходящие в биопленке, отличаются от физиологии чистых культур этих же бактерий. Соответственно, реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биопленке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре.

Такая организация обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и является основой конкурентного выживания в экологической нише. Сообщество микроорганизмов организует единую генетическую систему в виде плазмид — кольцевых ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их пищевые (трофические), энергетические и другие связи между собой и внешним миром [82].

Последнее получило специальное определение как социальное поведение микроорганизмов — Quorum Sensing [18]. Считается доказанным, что формирование биопленки повышает вирулентность и патогенность всех возбудителей. Подсчитано, что частота инфекций, обусловленных биопленкой, особенно в развитых странах мира, составляет 65%-80% [106].

Биопленки — это высокоупорядоченные бактериальные сообщества, которые позволяют бактериям жить в прикрепленном состоянии. Биопленки могут состоять из одного или нескольких видов бактерий. Их пронизывает сеть водных каналов, обеспечивающих доставку питательных веществ всем членам сообщества и удаляющих продукты метаболизма. В одной биопленке можно наблюдать различные образцы генной экспрессии, что говорит о том, что члены сообщества имеют «специфические обязанности», которые, комбинируясь с другими, усиливают жизнеспособность всего консорциума [16].

Специальные исследования показали [142], что в биопленке по-иному, в сравнении с чистыми культурами бактерий, происходят их многочисленные физиологические процессы, в том числе продукция метаболитов и биологически активных веществ. Реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биопленке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Подобная организация обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и, следовательно, является залогом конкурентного выживания в экологической нише. В организме человека специфическое преимущество такой

организации заключается в обеспечении гомеостаза органов, функциональность которых зависит от населяющих их микробов [121].

Функции биопленки:

1. Связывает клетки, органические и неорганические субстраты.
2. Повышает адгезию бактерий к эпителию и любым поверхностям (живого и неживого происхождения).
3. Снижает эффективность антибактериальной терапии.
4. Помогает выживать бактериям в меняющейся внешней среде.

Механизмы увеличения устойчивости бактерий к антибиотикам в биопленках:

1. Ограничение проникновения антибиотиков через биопленки.
2. Ограничение питания и измененная микросреда в биопленке приводят к уменьшению скорости деления бактерий, вследствие чего остается меньше мишеней для действия антибиотиков.
3. Адаптивные реакции.
4. Генная изменчивость у персистирующих в биопленке бактерий [14, 40, 127].

Функционально биопленка напоминает плаценту. Если плацента регулирует взаимоотношения плода и организма матери, то биопленка выполняет схожую роль, регулируя взаимоотношения между макроорганизмом и окружающей средой.

Кроме того, микроорганизмы, входящие в состав биопленок, осуществляют многочисленные метаболические реакции, вовлекаясь в процессы синтеза и деградации как соединений, образуемых в организме хозяина, так и чужеродных субстанций, участвуют в процессах распознавания, абсорбции и транслокации как полезных, так и потенциально вредных агентов [136].

При этом, как в любом микробиоценозе, в биопленках имеются постоянно обитающие виды бактерий (индигенная микробиота) и

транзиторные виды микробов. В состав кишечного содержимого входят представители 17 семейств, 45 родов и свыше 400 видов микроорганизмов, все они образуют сложнейшую по организации биопленку.

Терапевтическое воздействие на биопленки может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности, блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными агентами. Подобное лечение, действующее на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия [136].

Для синтеза факторов вирулентности, антибиотиков и формирования биоплёнок бактерии часто используют реакции кворум-сенсинга (Quorum sensing). Понятие «ощущение кворума» было предложено в 1994 году. Оно означает восприятие клетками изменений среды, которые наступают при достижении бактериальной культурой некоторой пороговой численности, и реакцию на эти изменения.

Однако функции и роль системы Quorum sensing (QS), которая обеспечивает социальное поведение бактерий, до сих пор остаются малоизученными и являются предметом крайне перспективного для медицинской практики научного поиска. В организме человека преимущество такой организации заключается в обеспечении гомеостаза органов, функциональность которых зависит от населяющих их микробов [86].

В результате активного изучения было обнаружено, что феномен QS широко распространён среди бактерий. Оказалось, что ряд генов, определяющих вирулентность патогенных микроорганизмов и устойчивость к лекарственным препаратам, регулируется по принципу QS, что имеет особое значение для медицины и поэтому вызывает высокий интерес научного сообщества к данной проблеме.

Сигнальные молекулы реагируют с рецепторным доменом сенсорного белка, что приводит к изменению его конформации, посредством чего передающий модуль сенсорного белка проводит сигнал к другому компоненту QS-системы – белку-регулятору ответа. Передача сигнала осуществляется через фосфорилирование белка-регулятора с использованием остатков аминокислот гистидина и аспарагина. Определяющим в основе функции всех регуляторных QS-систем является возрастание концентрации секретируемого аутоиндуктора в зависимости от увеличения плотности клеточной культуры [13, 14, 64].

Например, синтез плантарицина у *L.plantarum* находится под контролем системы кворум-сенсинга. Данный бактериоцин ингибирует рост многих видов грамположительных микроорганизмов, в том числе и патогенных, создавая поры в цитоплазматической мембране и тем самым нарушая ее проницаемость, что обеспечивает конкурентное выживание продуцента [55].

Изучение влияния ауторегуляторов, изменяющих условия жизнедеятельности лактобацилл в составе биопленки, способствующих перестройке физиологической активности клеток, несомненно, представляет научный и практический интерес. Сложности изучения функционирования жизнедеятельности формирующихся биопленок микроорганизмов определяются в первую очередь методической базой выполнения экспериментов.

При этом следует учитывать малые незначительные концентрации клеток в биопленке, а также чрезвычайно малые концентрации ауторегуляторов, что заставляет использовать в качестве детекторов определения влияния отдельные клетки микроорганизмов. В данном случае должны оцениваться этологические (поведенческие), физиологические реакции не только отдельных клеток, но и популяции клеток в целом, т.е. исследование должно быть выполнено на клеточно-популяционном уровне.

Механизмом адаптации доминантной микробиоты (бифидобактерий и лактобацилл) при действии микробных ауторегуляторов (алкилоксибензолов)

является перестройка популяции бактерий, характеризующаяся сохранением диссоциантов со средними значениями антилизозимной активности (АЛА), увеличением доли клонов с высокими значениями биопленкообразования и стимуляцией их размножения, что обеспечивает индигенной микрофлоре селективное преимущество в микросимбиозе кишечника. Установлена регуляторная функция экзометаболизма аутобиоты в отношении аллохтонных микроорганизмов, основанная на их плеiotропном действии: способности в высоких концентрациях угнетать размножение условно-патогенных микроорганизмов, а в субингибиторных – модифицировать их персистентные свойства (АЛА и биопленкообразование) [49].

Установление закономерностей и особенностей образования биопленки лактобацилл на ранних стадиях формирования популяций будет способствовать пониманию процессов взаимодействия макроорганизма и больших концентраций клеток лактобацилл, привносимых в составе пробиотических препаратов, а также продуктов функционального питания для успешной коррекции микробиоты кишечника человека при различных состояниях.

1.4. Использование лактобацилл в составе препаратов для коррекции дисбактериозов кишечника (пробиотики, аутопробиотики)

Экологическая система, компонентами которой является макроорганизм, его микробиота и окружающая среда, характеризуется единством и способностью к саморегуляции. В результате различных неблагоприятных воздействий и патологических состояний могут происходить качественные и количественные изменения нормальной микробиоты кишечника. Многочисленные исследования последних десятилетий убедительно показали, что продукты питания содержат природные компоненты, не только обладающие пищевой ценностью для организма, но и регулирующие его многочисленные функции.

Существует значительный интерес к применению кисломолочных бактерий в качестве пробиотических средств для восстановления и сохранения нормальной кишечной микробиоты. Получившие определение «микробные клеточные препараты или компоненты микробных клеток, которые оказывают благоприятное действие на здоровье и благополучие хозяина» пробиотики играют существенную роль в этих процессах.

В научных публикациях обсуждаются вопросы не только рационального, но и так называемого оптимального (здорового) питания, которое предусматривает индивидуальный подбор пищи, в максимальной степени удовлетворяющей потребностям человека в энергетических, пластических и регуляторных компонентах. При этом биологически активные вещества, содержащиеся в продуктах питания, при систематическом употреблении способны поддерживать и регулировать конкретные физиологические функции организма, биохимические и поведенческие реакции, что может способствовать сохранению здоровья человека, его устойчивости к заболеваниям [60, 63, 76, 109, 120].

В отраслевом стандарте Приказ МЗ РФ №231 от 2003 г. «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» под дисбактериозом кишечника понимают клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава микробиоты кишечника с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений и с возможным развитием желудочно-кишечных расстройств.

Дисбактериоз кишечника всегда вторичен и представляет собой изменение состава микробиоты определенного биотопа, транслокацией различных ее представителей в несвойственные биотопы, а также метаболическими и иммунными нарушениями [19, 25, 67, 99].

Одной из основных причин дисбактериозов является то, что организм человека, представляя собой открытую систему, требует постоянного внесения внутрь продуктов питания, содержащих все необходимое для

своего роста и развития, а также других дополнительных веществ (в том числе и лекарств) для обеспечения условий гомеостаза, функционирования всей системы в целом. Именно продукты питания являются первичными и последующими (в том числе и дестабилизирующими) источниками формирования и поддержания микробиоты кишечника [17].

В настоящее время для восстановления нарушенного микробиоценоза наиболее распространенным приемом является введение человеку или животному в больших количествах антагонистических штаммов бактерий в основе пробиотиков – фармакопейных препаратов, пищевых добавок или продуктов функционального питания. Эти препараты и продукты питания на основе живых микроорганизмов являются достаточно эффективными лечебно-профилактическими средствами [74].

В целом препараты, применяемые для восстановления нормальной микробиоты кишечника, принято подразделять на группы: пробиотики, симбиотики, синбиотики и пребиотики [6]. Однако, по данным литературы, все группы вышеуказанных препаратов рассматриваются вместе под общим названием – пробиотики.

Пробиотики – это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через стабилизацию и оптимизацию функции его нормальной микробиоты [7]. Пробиотические бактерии должны обладать набором свойств: антагонистической активностью, кислотообразованием, отсутствием факторов патогенности, безопасностью при применении и др. – позволяющим им конкурировать с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами [74]. Для создания пробиотических препаратов наиболее часто используют штаммы бифидобактерий и лактобацилл. Эти препараты применяются с целью нормализации микробиоценоза желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), повышения неспецифической резистентности организма,

стимуляции функциональной деятельности пищеварительной системы, для профилактики инфекций.

Симбиотики – это лекарственные препараты, в состав которых входит несколько видов микроорганизмов-пробиотиков или несколько штаммов одного и того же типа бактерий. Например, любой препарат, содержащий 2 – 3 вида лактобацилл или бифидобактерии и молочнокислые стрептококки, будет являться симбиотиком.

Эубиотики — это бактерии или грибки, которые постоянно находятся в кишечнике человека с нормальным состоянием здоровья. Микроорганизмы подавляют рост и размножение патогенных вирусов и бактерий, а также восстанавливают микробиоту кишечника и функциональную активность пищеварительного тракта [51].

Пребиотики – это препараты немикробного происхождения, способные оказывать позитивный эффект на организм хозяина через селективную стимуляцию роста или усиления метаболической активности нормальной микробиоты кишечника [20]. В эту группу входят препараты, относящиеся к различным фармакотерапевтическим группам, но обладающие общим свойством – стимулировать рост и развитие нормальной микробиоты кишечника.

Пребиотики относятся к одной из основных категорий функционального питания, и, таким образом, использование пищи с большим количеством балластных веществ (пищевые волокна, отруби) [9, 52, 141] является основной частью профилактических мероприятий для предупреждения развития нарушений микробиоценоза кишечника.

К пребиотикам в чистом виде предъявляются достаточно строгие требования: они не должны подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами человека, не должны абсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта, должны селективно стимулировать один вид или определенную группу микроорганизмов, резидентных для толстой кишки.

Применение пробиотиков и пребиотиков приводит к одному и тому же результату - увеличению числа молочнокислых бактерий, естественных обитателей кишечника [65, 99]. Таким образом, эти препараты, в первую очередь, должны назначаться детям грудного возраста, пожилым людям и тем, кто находится на стационарном лечении [70].

Синбиотики – комбинация пребиотиков и пробиотиков [53]. Часто это биологически активные добавки, входящие в состав функционального питания, обогащенные одним или несколькими штаммами представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

К функциональным продуктам питания (ФПП) в настоящее время относятся:

1. Заменители грудного молока и продукты детского питания, которые можно использовать при непереносимости отдельных компонентов пищи.
2. Кисломолочные продукты с пробиотиками и пребиотиками.
3. Закваски для приготовления кисломолочных напитков с пробиотической и пребиотической активностью.
4. Каши, крупы, хлебобулочные изделия, которые дополнительно содержат пищевые волокна, ферменты, витамины и микроэлементы.
5. Концентраты напитков с различным оздоравливающим воздействием на организм.

Требования к биопрепаратам (производственным штаммам микроорганизмов) [67]:

- наличие полезного воздействия на организм хозяина, подтвержденного лабораторными исследованиями и клиническими наблюдениями;
- штаммы должны быть идентифицированы с учетом генетических признаков;
- при длительном использовании они не должны вызывать побочных эффектов, штаммы должны быть непатогенными и нетоксичными;

- наличие колонизационного потенциала, то есть сохранение в пищеварительном тракте до достижения максимального положительного действия (должны быть устойчивыми к низким значениям рН, желчным кислотам, антимикробным субстанциям, продуцируемым индигенной микробиотой с адгезией к эпителию соответствующих слизистых оболочек);
- наличие выраженной антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам;
- наличие стабильных характеристик как в клиническом, так и в технологическом плане (обладать производственно-ценными свойствами);
- наличие высокой скорости роста и размножения в условиях, близких к таковым в кишечном тракте, накопление биомассы с высоким количеством жизнеспособных клеток не менее $1 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$ КОЕ в 1 см³;
- штаммы молочнокислых палочек должны продуцировать преимущественно L (+) – изомер молочной кислоты;
- при введении в больших количествах они должны обладать минимальной способностью к транслокации из просвета пищеварительного тракта во внутреннюю среду макроорганизма;
- наличие четкой физиолого-биохимической и генетической маркировки как для исключения фальсификации, так и для периодического контроля идентичности свойств исходных и производственных культур.

В настоящее время выделяют 4 поколения пробиотиков [68]:

5. К 1-му поколению пробиотиков относят монокомпонентные препараты (Колибактерин, Бифидумбактерин, Лактобактерин), содержащие 1 штамм бактерий.

6. Препараты 2-го поколения (Бактисубтил, Биоспорин, Споробактерин и др.) основаны на использовании неспецифических для человека микроорганизмах, и они являются самоэлиминирующимися антагонистами.

7. Препараты 3-го поколения включают поликомпонентные

пробиотики, содержащие несколько симбиотических штаммов бактерий одного вида (Ацилакт, Аципол и др.) или разных видов (Линекс, Бифиформ) с взаимоусиливающим действием. От препаратов 1-го поколения они отличаются более сбалансированным составом.

8. К 4-му поколению относят иммобилизованные на сорбенте микроорганизмы. В этом случае сорбированные бактерии эффективно колонизируют слизистую оболочку кишечника, оказывая более выраженное протективное действие, чем несорбированные аналоги.

9. В настоящее время активно разрабатывается 5 поколение пробиотических лекарств под общим названием метабиотики [75].

Метабиотики – структурные компоненты пробиотических микроорганизмов и/или их метаболитов и/или сигнализирующих молекул с известной химической структурой, которая может оптимизировать главные специфические физиологические функции, метаболические и/или реакции поведения, связанные с деятельностью макроорганизма и его микробиоты.

Другие пробиотики могут произвести различную установку биоактивных молекул низкого молекулярного веса (LMW). Эти метаболиты, изолированные из пробиотических микроорганизмов или их культурной жидкости, могут стать основой для производства продуктов функционального питания и лекарств для профилактики и лечения различных болезней. Некоторые микробные субстанции LMW после проникновения могут достигать пищеварительного тракта и модулировать врожденные и приобретенные устойчивые ответы, нейтрализуют токсины, способные приводить к вредным эффектам в клетках и тканях, расположенных за пределами кишечника [66, 99].

Препараты-пробиотики назначаются детям и взрослым при лечении острых кишечных инфекций (шигеллез, сальмонеллез и др.), они широко используются при лечении заболеваний пищеварительного тракта, сопровождающихся развитием дисбактериоза, при аллергических

заболеваниях, пневмониях, острых и хронических бронхитах, сопровождающихся дисбактериозами [49, 56, 61, 122].

Эффект воздействия пробиотика, видимо, зависит от конкретного штамма или нескольких штаммов (видов) микроорганизмов, входящих в его состав. Эффекты, свойственные определенному штамму, не должны переноситься на другие штаммы этого же вида. Необходимо изучение механизмов действия каждого пробиотика, чтобы выяснить, можно ли общими механизмами объяснить их активность при различных физиологических и патологических состояниях [95].

Механизм действия пробиотиков [85, 110].

1. Подавляют рост потенциально вредных микроорганизмов в просвете кишечника в результате продукции различных антимикробных веществ (например, лактацин, низин, молочная, уксусная, муравьиная и другие органические кислоты).

2. Конкурируют с патогенными микроорганизмами за одни и те же рецепторы адгезии (рецепторы для прилипания бактерий к стенке кишечника) и питательные вещества.

3. Стимулируют рост и размножение выживших представителей собственной полезной микробиоты хозяина в результате выработки витаминов и других ростостимулирующих факторов и питательных субстратов (летучие жирные кислоты, аминокислоты - аргинин, глутамин, цистеин и др.).

4. Нормализуют рН среды кишечника.

5. Нейтрализуют токсины, вырабатываемые вредными микроорганизмами.

6. Активируют иммуннокомпетентные клетки и стимулируют иммунитет.

7. Снижают секрецию медиаторов воспаления в кишечнике.

8. Восстанавливают структуру и функции биопленки, выстилающей

слизистую пищеварительного тракта.

9. Снижают кишечную проницаемость для токсинов, аллергенов, антигенов.

Кроме того, препараты-пробиотики, используемые с целью коррекции микробиоценоза кишечника [2, 21, 105], назначают также при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта больным хирургического профиля с заболеваниями кишечника, печени, поджелудочной железы в период предоперационной подготовки и после оперативных вмешательств. Эти препараты широко применяются после проведения курсов этиотропной, гормональной и лучевой терапии, назначения нестероидных противовоспалительных препаратов [117]. Таким образом, это косвенно свидетельствует о глобальном значении микробиоты кишечника для нормализации состояния макроорганизма, регуляции его жизнедеятельности. Лактобациллы, входящие в состав пробиотиков, как их ведущая представительная часть играют в этом одну из самых важных ролей.

Пробиотики обладают возможностями, применимыми в целях иммуномодулирования, лечения и профилактики нарушений и заболеваний, таких как диарея, гастроэнтерит, воспаление кишечника, ротавирусная инфекция, урогенитальные инфекции, непереносимость лактозы и рак [115]. Назначение детям с дефицитом секреторного IgA пробиотиков на основе молочнокислых бактерий способствует регуляции системы местного иммунитета. Применение пробиотиков приводит к значительному снижению риска развития некротизирующего энтероколита (НЭК) и летального исхода у недоношенных новорождённых с очень низкой массой тела (ОНМТ) [122]. Что касается нозокомиальных инфекций дыхательной системы, то применение пробиотика, в состав которого входили *Lactobacillus GG*, приводило к снижению риска их возникновения [114]. Результаты исследования показывают, что употребление молочного продукта (Актимель), содержащего пробиотический штамм *L.casei DN-114001*,

достоверно уменьшает среднюю длительность эпизода острого респираторного заболевания (ОРЗ) или инфекции ЖКТ у пожилых людей [89].

В Российской Федерации пробиотики на основе лактобацилл применяются в виде фармакопейных препаратов (в различных лекарственных формах – таблетки, ампулы, свечи), включающих в себя лиофилизированные бактерии (Лактобактерин, Ацилакт, Аципол и др.), биологически активных пищевых добавок (сухие или жидкие закваски ацидофильных лактобацилл типа «Наринэ») и различных функциональных продуктов питания (ферментированные лактобациллами молоко, фруктовые, овощные соки и т.д.).

В качестве пробиотических лактобацилл широко используются штаммы:

1. *L.acidophilus LA1(NCC533)* – иммуностимулятор, адьювант, корректор микробиоты кишечника.
2. *L.acidophilus NCFB 1748*, который снижает активность тех фекальных ферментов, которые ответственны за накопление в просвете кишечника субстанций, обладающих мутагенной активностью, предотвращающих развитие запоров.
3. *L.rahmnosus GG – ATCC 53013*, который предотвращает развитие антибиотико-ассоциированных диарей, диарей, вызванных ротавирусом и *C.difficile*. Используются для профилактики и лечения различных кишечных инфекций бактериальной природы, болезни Крона, для профилактики кариеса, в качестве адьюванта вакцин).
4. *L.casei Shirota* – корректор микробиоты кишечника, иммуностимулятор, снижающий активность кишечных ферментов и связанной с ним мутагенности, использующийся в комплексной терапии рака толстой кишки, мочевого пузыря, ускоряющий рост и накопление массы тела и увеличивающий эффективность усвоения пищи.
5. *L.reuteri* – штамм *Reuteri*, иммуностимулятор, корректор кишечной микробиоты, который предотвращает развитие госпитальных инфекций,

используется для профилактики и лечения острых инфекций, вызванных сальмонеллами и криптоспоридиями.

Вышеуказанные пробиотические культуры применяются в виде лекарственных препаратов (таблетки, порошки, капсулы), а также в форме кисломолочных продуктов, сыров, творога и как пищевая добавка в сухих смесях для детского питания.

Применение пробиотиков здоровыми людьми также приветствуется для улучшения и сохранения здоровья населения. Систематическое использование пробиотических препаратов, биологически активных добавок и функциональных продуктов питания (ФПП) корректируют дисбактериозы и кишечные инфекции, усиливает иммунитет, предотвращает развитие аллергических осложнений, нормализует пул гистамина и щавелевой кислоты (причины подагры), оказывает гипохолестеринемический, противоопухолевый и другие положительные эффекты на человека. Таким образом, эти препараты могут назначаться детям грудного возраста, пожилым людям и тем, кто находится на стационарном лечении [88, 117, 129].

Устранение или подавление нежелательных микроорганизмов в ЖКТ происходит через производство различных антимикробных субстанций (органические кислоты, перекиси водорода, окись азота, и т.п.), конкуренции с рецепторами для нейтрализации и/или подавления вредных бактериальных токсинов, подавления производства или уничтожения сигнальных молекул кворум-сенсинга патогенных микроорганизмов [145].

Взаимодействие пробиотических микроорганизмов с нормофлорой сопровождается улучшением колонизации слизистой оболочки кишечника, образованием дополнительных рецепторов для прилипания, производством кворума микроорганизмов, способного считывать сигнальные молекулы, общие с индигенной микробиотой, производством низкомолекулярных белков, подобных белкам той индигенной микробиоты. При этом происходит активное взаимодействие в ходе метаболических реакций через обмен

сигнальных молекул, ферментов, питательных веществ и т.п. [91, 114].

Эти препараты и продукты функционального питания на основе живых микроорганизмов являются эффективными лечебно-профилактическими средствами, однако этот эффект в значительной степени ограничен тем, что используемые в качестве действующего начала штаммы микроорганизмов являются чужеродными для организма реципиента. В результате происходит обычное при гетеротрансплантации отторжение, т.е. вводимые микроорганизмы не приживляются на слизистых кишечника и быстро выводятся из организма. Для получения ожидаемого эффекта от применения таких пробиотиков требуется длительный курс (не менее 2 – 3^х недель) назначения больших количеств пробиотических микроорганизмов.

Однако, используя пробиотики, следует помнить, что они являются живыми микроорганизмами, которые при определенных условиях в организме могут вызывать нежелательные эффекты.

К настоящему времени зарегистрированы единичные случаи генерализации пробиотических штаммов микроорганизмов, но эти эпизоды описаны у тяжелобольных с иммунодефицитными состояниями. К сожалению, с расширением спектра показаний для назначения пробиотиков стала накапливаться информация, что положительный эффект пробиотиков даже при длительном применении нередко носит временный характер, а порой и полностью отсутствует. Более того, хотя безопасность использования пробиотических препаратов, добавок и продуктов питания является достаточно хорошо установленным фактом, появились отдельные сообщения о возникновении у лиц, длительно принимающих живые пробиотические микроорганизмы, различных осложнений [110, 139].

В связи с этим на современном этапе необходимо проведение тщательно спланированных (рандомизированных, плацебо контролируемых) клинических испытаний пробиотиков, в которых будет широко исследоваться микробиота пациентов, будут четко определены конечные

точки и подробно проинформированные пациенты будут согласны принимать лечение.

Разработка новых пробиотиков активно продолжается, и исследования в этом направлении являются весьма перспективными для обеспечения человека новыми нормализующими микробиоценоз кишечника биологическими препаратами и ФПП [123]. Потенциал пробиотиков включает в себя устранение или подавление нежелательных микроорганизмов, положительного взаимодействия с индигенной микробиотой и кишечным эпителием, модификацию локальных устойчивых ответов с клетками и метаболическими магистралями ЖКТ.

Одной из главных причин случаев неэффективности пробиотиков является чужеродность для человека входящих в их состав микроорганизмов, а также недостаточный учет высокой видовой, индивидуальной и анатомической специфичности микробиоты лиц, которым назначают эти средства. В результате штаммы микроорганизмов, проявляющие в лабораторных условиях или на экспериментальных животных пробиотическую активность, совершенно необязательно проявляют схожую активность на человеке.

Пробиотические препараты, нормализующие микробиоценоз кишечника, включают также особую группу препаратов – аутопробиотики. Эта группа препаратов не может быть фармакопейно зарегистрирована под определенным названием, поскольку в препаратах каждый раз используют штаммы из состава аутофлоры конкретного индивидуума. Однако, на наш взгляд, не упоминать аутопробиотики в общей структуре классификации пробиотических препаратов нельзя.

Микробная экология каждого человека представляет собой чрезвычайно сложную по составу систему. Поэтому практически невозможно разработать пробиотики для каждого индивидуума при поддержании нормальной микробиоты путем простого механического объединения

отдельных промышленных и/или фармакопейных штаммов микроорганизмов [63]. Кроме того, пробиотические микроорганизмы, даже человеческого происхождения (выделенные из человека вообще), бывают иммунологически частично или полностью несовместимы с конкретным человеком и вскоре после прекращения их применения быстро удаляются из организма [68, 109].

Клинико–экспериментальные работы по бактериотерапии дисбактериозов показали, что лучший эффект достигается при индивидуальном подборе донорских штаммов либо при использовании аутофлоры [87].

С учетом вышеизложенного учеными [47] разработан оригинальный способ получения аутопробиотиков, содержащих живые бифидо- и лактобациллы, индигенные для хозяина, которому они предназначены. При этом бифидо- и лактобациллы выделяются одновременно в виде естественных комплексов кишечника человека и/или животных путем предварительной деконтаминации содержимого толстой от посторонней микробиоты.

Все это служит основанием для дальнейшего создания препаратов пробиотиков на основе аутоштаммов, так называемых аутопробиотиков («ауто» - значит «собственный»).

Создание общедоступных технологий выделения и изоляции аутоштаммов бифидо- и лактобацилл крайне важно для устранения микрoэкологических нарушений кишечника. Фундаментальный характер разработок в данном направлении может быстро перейти в практическую плоскость использования препаратов аутопробиотиков, содержащих бифидо- и лактобациллы для лечения и коррекции дисбактериозов кишечника, а также поддержания гомеостаза организма конкретного индивидуума в повседневной жизни.

Резюме. Микробиота пищеварительного тракта наиболее представительна по своему качественному и количественному составу.

Микроорганизмы свободно обитают в полости пищеварительного тракта, а также колонизируют слизистые оболочки в виде биологической пленки.

Исследования показывают, что отношения между человеком и нормальной кишечной микробиотой являются взаимовыгодными. Однако под влиянием факторов окружающей среды, стрессовых воздействий, широкого и бесконтрольного применения антимикробных препаратов, лучевой терапии и химиотерапии, нерационального питания и т.д. происходят нарушения в нормобиоте кишечника. Однако существует большое количество различных пробиотических препаратов и продуктов питания, содержащих живые лакто- и бифидобактерии, способные вызвать функционально положительные перестройки в микрофлоре кишечника человека.

С точки зрения исследователя, изучающего развитие популяций лакто- и бифидобактерий, предпочтение может быть сделано в пользу лактобацилл, поскольку они на клеточно-популяционном уровне чаще являются морфологически более гомогенными, палочковидными, что упрощает проведение экспериментов. Кроме того, культивирование их популяций менее сложно по сравнению с бифидобактериями, для которых требуется создание анаэробных условий. Таким образом, лактобациллы обладают разнообразными биологическими свойствами, активно участвуют в обменных и регуляторных процессах макроорганизма и представляют интерес как объект изучения для разработки функциональных продуктов питания, пробиотических, аутопробиотических препаратов при профилактике и лечении микрoэкологических нарушений.

Однако мало изучены самые начальные стадии (первые несколько поколений) развития лактобацилл (на этапе формирования микроколоний) с момента заселения среды до образования биопленок. Вероятно, это связано с недостаточно неразработанными методами исследования и трудностью в изучении начальных этапов культивирования микробных клеток.

Выполнение экспериментов с лактобациллами на клеточно-популяционном уровне в различных условиях культивирования позволит получить новую информацию о механизмах взаимодействия макроорганизма и изучаемой микробной культуры. Данная информация может послужить отправной точкой в перспективных исследованиях по получению аутопробиотических комплексов лактобацилл кишечника. Целесообразность постоянного использования аутокультур лактобацилл позволит в дальнейшем достигнуть максимального эффекта при восстановлении нормальной микробиоты кишечника.

ГЛАВА 2. Материал и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования являлось определение особенностей развития лактобацилл в оптимальных и измененных условиях среды культивирования. Анализ научной литературы, посвященной культивированию и применению лактобацилл, проведен на основе клинико-лабораторных методов исследования. Планирование и проведение исследований осуществлялось на основе классических и современных методов микробиологии: стационарном и проточном периодическом микрокультивировании, периодическом лабораторном культивировании и молекулярном методе исследования, а также методов статистической обработки результатов.

Штаммы микроорганизмов

В работе использованы типовые коллекционные и свежевыделенные штаммы микроорганизмов.

Штаммы, выделенные из коммерческих лиофилизированных пробиотических препаратов: *L.acidophilus* - «Лактобактерин» производство «Биомед» ОАО им. И. И. Мечникова; *L.fermentum 90T-C4* - «Лактобактерин» производство НПО «Микроген»; *L.acidophilus n.v. Ep 317/402* – «Наринэ», ООО «НАРЭКС».

Штаммы, выделенные из функциональных продуктов питания (йогурты): *L.rhamnosus* и *L.casei* - «Иммунеле»; *L.casei DN-114001 defensis* - «Актимель»; *L.rhamnosus LGG ATCC 53103* - Био баланс; *L.casei* - «Белая киска».

Музейные штаммы микроорганизмов:

Escherichia coli M-17, *Staphylococcus aureus N-3*, *Staphylococcus sp 1(S.albus)*, *Staphylococcus sp 2 (S.citreus)*, грибы рода *Candida*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella spp.*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri S-50* и *Shigella flexneri Rd* из коллекции кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России., а так

же - *L.acidophilus* НК 1 ГКНМ №175 (сер. 04 от 22.03.11) из коллекции ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии Г.Н. Габричевского. Используемые в работе штаммы лактобацилл по ферментативной активности соответствуют данным эталонных штаммов [71].

Питательные среды

Производство ФГУН ГНЦПМиБ г. Оболенск

Среда 1. Питательная среда для выделения и культивирования лактобактоагар следующего состава (г/л):

Панкреатический гидролизат рыбной муки – 20.0

Экстракт пекарных дрожжей – 5.0

Экстракт мясной – 5.0

Глюкоза – 20.

Калий фосфорнокислый однозамещенный – 2.0

Натрий уксуснокислый – 5.0

Твин-80 – 1.0 мл.

Аммоний лимоннокислый однозамещенный – 2.0

Магний сернокислый – 0.1

Марганец хлористый – 0.05

Агар – 13.0 ± 2.0

pH 5.7 ± 0.3

Среда 2. MRS (жидкая) для культивирования молочнокислых микроорганизмов

60 г порошка растворить при нагревании в 1 дм³ дистиллированной воды, добавить 1 г твина 80

pH 6.4 ± 0.2

Среда 3. Среда для культивирования *Shigella flexneri* S-50 и *Shigella flexneri* Rd (г/л):

Солевой раствор (NH₄Cl – 2.5 г, Na₂HPO₄·2H₂O – 15.0 г, KH₂PO₄ – 6.2 г, Na₂SO₄·2H₂O – 0.5 г, MgSO₄·7H₂O – 0.2 г, H₂O – 1000 мл) – 1000 мл

Дрожжевой экстракт Дифко – 5

Триптон Дифко – 10

Агар Дифко – 10

Среда 4. «Голодный агар»

Физиологический раствор

1% агар-агара Bacto Agar «Тип USA» Ferak Berlin

Микробиологические методы исследования

Использованные в настоящей работе методы позволят детально рассмотреть вопросы культивирования и адаптивное поведение лактобацилл на различных уровнях их развития: от клеточного до популяционного. Выбранные для исследования методы, на наш взгляд, наиболее адекватно и быстро позволяют судить о направленности адаптивного процесса изучаемых бактериальных культур в ходе их культивирования. Также они дают предпосылки для дальнейшего изучения взаимодействия лактобацилл с другими микробными культурами при совместном их культивировании, а также воздействие биологически активных веществ природного происхождения для стимуляции роста и повышения адаптивной способности лактобацилл.

Метод биосовместимости. Определение биосовместимости лактобацилл в отношении некоторых микроорганизмов нормальной микрофлоры кишечника

С этой целью использовали прямой метод биосовместимости при совместном культивировании на плотной питательной среде [16]. Обязательным условием для применения этого метода является способность исследуемых микроорганизмов к росту на питательных средах, предназначенных для культивирования лактобацилл (жидкой MRS и плотной лактобакагар). Нами выполнена модификация методики определения биосовместимости (Рац. предл №2507, ИвГМА, 2012). Сущность предложенного способа заключается в следующем: все включенные в проводимый эксперимент микробные культуры, выросшие в течение суток

на скошенной агаризованной питательной среде, вносили с помощью стерильной бактериальной петли в необходимом количестве в физиологический раствор. Приготовленную таким образом микробную взвесь оценивали относительно стандарта мутности в 10 единиц (отраслевой стандартный образец мутности ОСО 42-28-85-02) для достижения метрологической совместимости по количеству клеток в объеме исследуемой микробной культуры [58].

Нанесение на поверхность агаризованной питательной среды определенного количества посевного материала выполняли с помощью стеклянного цилиндра диаметром 9 мм с ошлифованной поверхностью торца.

С этой целью фламбированный стеклянный цилиндр (рац.предл. Способ оценки биосовместимости микробных культур, №2507, 20.03.12 г. ИвГМА., Сафонова (Кириленко) М.А., Кузнецов О.Ю.) погружали во взвесь микробной культуры на определенную глубину, до риски на стеклянном цилиндре. Затем торцевой поверхностью цилиндра делали отпечаток на чашке со стерильной плотной питательной средой (лактобакагар). После нанесения культур на питательную среду необходимо время для впитывания жидкости в агар, и затем повторно, отступив на 1-2 мм от ее края, делали отпечаток другой культуры в той же последовательности нанесения.

Для исключения влияния последовательно наслоенных капель культур пробиотических лактобацилл и тестируемых микроорганизмов на характер роста в зоне совместного культивирования каждый опыт ставят в двух повторях, изменяя положение культур. После подсыхания второго отпечатка чашки переворачивают вверх дном и инкубируют в необходимых для роста бактериальных клеток условиях, при температуре 37⁰С в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа и 16% кислорода. Контролем служили капли одной и той же культуры, наслоенные друг на друга по описанной выше методике.

Учет результатов проводили через 24 часа после начала инкубации. При задержке роста одной из исследуемых культур взаимоотношения между

ними рассматривались как антагонистические, а сами культуры относили в категорию бионесовместимых.

Культуры считали биосовместимыми в случае обнаружения полного «слияния» пятен или усиления роста обоих исследуемых штаммов в зоне совместного культивирования (мутуализм, синергизм, сателлизм). Если одна из культур в зоне совместного культивирования «выходит наверх», подавляя рост второй культуры, независимо от последовательности их нанесения, такой вариант расценивали как слабый антагонизм.

Определение отсроченной антагонистической активности лактобацилл в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий

С этой целью использовали метод выявления отсроченного антагонизма в ходе совместного культивирования на плотной питательной среде (лактобакагар). При использовании этого метода предварительно определяли способность микроорганизмов к росту на питательной среде с рН 7,1, подходящей для культивирования лактобацилл.

Сущность метода заключается в следующем: суточные культуры пробиотических лактобацилл, выращенные на поверхности скошенной питательной среды, предварительно разводили в физиологическом растворе до стандарта мутности в 10 единиц, а потом наносили на поверхность плотной питательной среды (см. выше Метод биосовместимости) далее культивировали при необходимых для роста условиях в течение 24 часов.

Затем суточные культуры патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, выросшие на скошенном агаре, разводили в физиологическом растворе и делали отпечатки на колонии лактобацилл, отступив от ее края на 1-2 мм. После подсыхания отпечатка чашки переворачивали вверх дном и инкубировали в необходимых для роста бактериальных клеток условиях, при температуре 37⁰С в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа и 16% кислорода.

Результат опыта учитывали визуально по наличию признаков подавления или даже задержки роста чувствительной культуры в зоне совместного культивирования.

Микрокультивирование как особый метод исследования начальных стадий развития бактерий (описание микрокамер которые были использованы в работе)

В работе мы использовали микрокамеры для световой фазовоконтрастной микроскопии различной конструкции: стационарные и проточные.

Стационарная камера диффузного типа для культивирования микроорганизмов (СКДТ).

Стационарная камера диффузного типа, примененная нами в исследованиях, представляет собой модификацию А.М. Пешкова – отр. рац. предл. №0-2893, 1987 Кузнецов О.Ю. «Способ сборки стационарной микрокамеры диффузионного типа для культивирования микроорганизмов» (Приложение 1).

Для приготовления микрокамер использовали так называемые «слайдовые агаровые пластинки», получаемые путем заливки расплавленного «голодного» агара в щель (0,3 мм) между двумя обезжиренными, параллельно расположенными предметными стеклами. После того как агар застывал, верхнее стекло снимали, сдвигая его в сторону. Сохраняя стерильность, вырезали стандартный диск агара (6x1 мм) и переносили его на предварительно приготовленное покровное стекло толщиной не более 0,17 мм. Суточную культуру разводили физиологическим раствором до 10^{-3} и наносили на агаровый диск методом стекающей капли.

Способ сборки и подготовки к работе микрокамеры:

1. На тонкий слой «голодного» агара (6 x 1 мм), находящегося на покровном стерильном стекле, инокулировали исследуемую культуру.

2. После испарения с поверхности агара избыточной влаги и прошедшей за это время адгезии клеток поверхность накрывали вторым покровным стеклом меньшего размера.

3. Камеру с трех сторон окантовывали герметизирующей замазкой (смесь канифоль + парафин + пчелиный воск – 3 + 3 + 4 весовые части).

4. С помощью стерильной пастеровской пипетки в капиллярную щель между стеклами к слою агара с клетками подводили жидкий питательный бульон.

5. По окончании заполнения камеры герметизирующей замазкой закрывали четвертую сторону микрокамеры, и камера готова к работе. Поступление питательных компонентов среды происходит диффузно и через агар, а также через узкокапиллярное пространство между верхним стеклом и агаром с находящимися на нем бактериальными клетками (см. Приложение).

Культивирование микроорганизмов выполняли на нагревательном столике с точностью поддержания температуры $37 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ в микрокамере.

Предлагаемый способ сборки микрокамеры значительно уменьшает время контакта бактериальных клеток с компонентами питательной среды. Тем самым сокращается «слепой» промежуток времени наблюдения, т.к. питательной средой камера заполняется непосредственно в конце ее сборки. Это позволяет начать изучение отдельных бактериальных клеток с более ранних моментов культивирования. Тем самым она может быть применена для выявления динамических характеристик роста и развития клеток.

Проточная микрокамера для культивирования микроорганизмов.

Особенность работы с камерой проточного типа состоит в том, что появляется возможность исследования реакции клеток микроорганизмов при активной замене питательной среды различного состава при культивировании микроорганизмов (а. с. №1339123).

Камера данного типа готовилась к работе непосредственно перед проведением эксперимента аналогично другим (стационарным – см. выше) камерам для прижизненной микроскопии клеток.

Конструкция камеры представляет собой металлическую основу, в которой высверлена ниша. В центре данной ниши выполнено сквозное отверстие, размер которого немного меньше размера используемых для конструкции камеры покровных стекол. С двух противоположных сторон от края основы камеры по направлению к центру ниши фрезой выбраны пазы. В эти пазы с помощью специального флюса (ортофосфорная кислота) при нагревании впаяны медицинские иглы.

На данной заготовке выполняли дальнейшую сборку камеры. В нишу металлической основы (корпуса) камеры разогретым над пламенем спиртовки пинцетом или другим инструментом наносили слой расплавленной герметизирующей замазки (см. выше - изготовление СКДТ), после чего сверху размещали стерильное покровное стекло. Стекло должно быть размещено на слой расплавленной замазки с достаточно высокой температурой, чтобы погрузиться в нее и образовать нижнюю поверхность камеры в нише будущей проточной камеры.

После того как стекло остынет, сверху на середину стекла соосно отверстию в нише основы камеры помещали диск «голодного агара», который укрепляли с 4 сторон ребрами-упорами, сформированными из герметизирующей замазки. На данный диск выполняли посев исследуемой культуры микроорганизмов и давали избытку жидкости диффундировать в агар, а клеткам микробной культуры адгезироваться на поверхности агаризованной среды. Использование агарового блока позволяло адгезировать клетки в камере, что давало возможность наблюдения за развитием одиночных клеток при их культивировании.

Далее вокруг диска с «голодным агаром» помещали металлические боковые ограничители, выполненные из кусочков мандрена в виде полуколец. Толщина мандренов для изготовления полуколец соответствовала толщине мандренов, которые вставлялись в иглы, приваренные к металлической основе камеры. Мандрены, вставленные в иглы, почти упирались в диск агара в центре будущей рабочей (ростовой) зоны камеры.

Металлические ограничители, размещенные вокруг агарового диска, плотно контактировали с данными мандренами. Затем всю конструкцию с диском, где находилась микробная культура, покрывали вторым покровным стеклом и между стеклами вносили расплавленную герметизирующую замазку. Для того чтобы предотвратить термическое повреждение засеянной на агаровый диск культуры, сверху на покровное стекло, по центру камеры, размещали металлический стержень, который равномерно прижимал верхнее покровное стекло и одновременно отводил излишнее тепло, защищая засеянную культуру от теплового шока. Герметизирующая замазка затекала с внешней стороны полуколец, формируя внутри камеры рабочую полость. Замазкой заполняли также и пазы с мандренами, выходящими из игл по направлению к рабочей ростовой полости камеры. Мандрены, вставленные в иглы, должны быть достаточно длинными, чтобы одновременно достигать рабочей зоны камеры и выходить из игл.

Для придания жесткости и повышения герметичности на стекло сверху дополнительно наносили расплавленную герметизирующую замазку. После застывания уплотнительной герметизирующей замазки камера практически готова.

Затем мандрены из игл удаляли, просто вытаскивая их с помощью пинцета. Таким образом, в уплотнительной герметизирующей замазке формировали каналы от внешних отверстий игл к внутренней полости камеры. Следует особо отметить факт, что часть канала от конца иглы до внутренней полости камеры формировали в последний момент и таким образом, что все этапы сборки камеры были выполнены с полным соблюдением правил асептики.

Необходимо помнить, что общая толщина камеры в сборе не должна превышать 2 мм согласно ограничениям, накладываемым особенностями выполнения фазово-контрастной микроскопии.

Существующие сложности в регуляции и поддержании стабильности потока жидкости с применением перистальтических насосов преодолели

подачей в камеру жидкости «самотеком». Для этого нами была использована система переливания крови и инфузионных растворов. Скорость потока питательной среды через микрокамеру регулировали каплеобразованием в пределах 3–5 капель в минуту. Подготовка системы подачи среды проводилась согласно инструкции. Перед подачей в микрокамеру питательную среду предварительно нагревали до 37⁰С в петлях системы ПК 11-01, заглубленных в водяную ванну ультра термостата ТВП-5.

Все этапы сборки стационарной камеры диффузного типа и проточной микрокамер, а также соединение проточной микрокамеры с системой подачи среды выполняли в стерильных условиях в боксе.

Для наблюдения и регистрации роста бактериальных клеток нами была использована микрокиноустановка МКУ-1 (№6027, 30.08.1960 г. Фирма «Ломо», г. Ленинград). Микрокамеру после сборки (подготовки к работе) помещали в термостолмик микрокиноустановки МКУ-1 при температуре 37⁰С ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Цейтраферная микрокиносъемка продолжалась в течение 8 часов, за клетками наблюдали с помощью камеры для микроскопа Score Tek DCM 900 (USB2.0) с временной регистрацией 1 кадр/10 минут в фазовом контрасте.

На первом снимке (начальном в серии) всем клеткам в поле зрения присваивали свои порядковые номера, которые сохраняли и за клетками-потомками. Для каждой клетки в поле зрения определяли момент окончания клеточного цикла и рассчитывали индивидуальное время генерации (τ).

Нефелометрический метод исследования

В работе использовали калориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2, предназначенный для измерения коэффициентов пропускания и оптической плотности жидкостных растворов и твердых тел, а также определения концентрации веществ в растворах.

Калориметр применялся для измерения оптической плотности выросшей культуры клеток лактобацилл на жидкой питательной среде с добавлением неспецифических факторов защиты, стимуляторов роста

органической природы (неохмеленное пивное сусло, порошок и сок гриба Шиитаке).

Технические данные: кюветой 3 мм между гранями и длиной волны 540 нм.

Оптическую плотность определяли по формуле:

$$D = - Lg \frac{F\lambda}{F_0\lambda}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность;

F₀λ – полный световой поток;

Fλ – световой поток, прошедший через исследуемую среду.

Таким образом измеряли и рассчитывали оптическую плотность с исследуемыми веществами.

Метод MALDI-TOF

Масс-спектры MALDI-TOF сняты на приборе масс-спектрометре Shimadzu фирмы Biotech Axima в режиме положительных ионов с использованием в качестве матрицы DHB (2,5-дигидроксибензойная кислота), CHCA (α-циано-4-гидроксикоричная кислота). Исследования были проведены на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Ивановского химико-технологического университета (ЦКП ИГХТУ).

В наших исследованиях взвесь бактериальных клеток в питательной среде MRS (при концентрации 10⁷ – 10⁹ кл/мл) смешивают с насыщенным раствором вещества-матрицы, что приводит к их совместной кристаллизации. Лазерный импульс вызывает ионизацию и взрывное испарение матрицы вместе с исследуемыми белками. Образующиеся ионы разгоняются в безвоздушной среде электростатическим полем, после чего пролетают через участок без ускорения и врезаются в мишень детектора; при этом прибор регистрирует время пролета ионов, которое будет отражать их массово-зарядовое соотношение. Таким образом, метод позволяет

регистрировать молекулярную массу фрагментов макромолекул комплекса аутопробиотических штаммов. [18, 78, 101]

Для определения оптимальной матрицы при проведении исследований методом MALDI TOF нами были выполнены эксперименты по сравнению спектров пролетной масс-спектрометрии макромолекул различных штаммов *L.acidophilus* из пробиотических препаратов с использованием в качестве матрицы СНСА и ДНВ. Результаты данных экспериментов представлены соответственно на Рисунках 1 и 2, где отображены спектры молекулярных масс фрагментов макромолекул различных экспериментов.

Анализ спектров осуществлялся с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. Учитывали значения, рейтинг которых составлял $\geq 1,7$. Статистическую обработку данных осуществляли с применением программного пакета Statistica 13. Для анализа использовали значение t-критерия Стьюдента. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для вариационных рядов рассчитывали коэффициент вариации (CV) по формуле $CV = 100 * (\sigma / \text{хср.}) \%$.

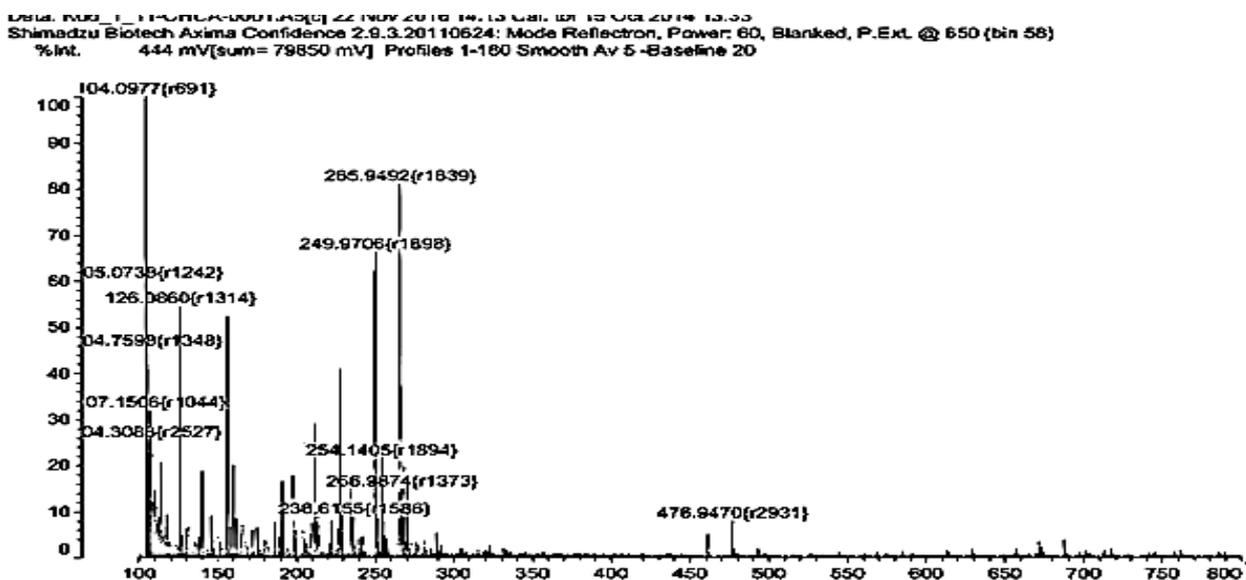


Рисунок 1 — спектр молекулярной массы фрагментов макромолекул *L.acidophilus*, определенных методом MALDI TOF для одного из экспериментов (матрица α -циано-4-гидроксикоричная кислота - СНСА)

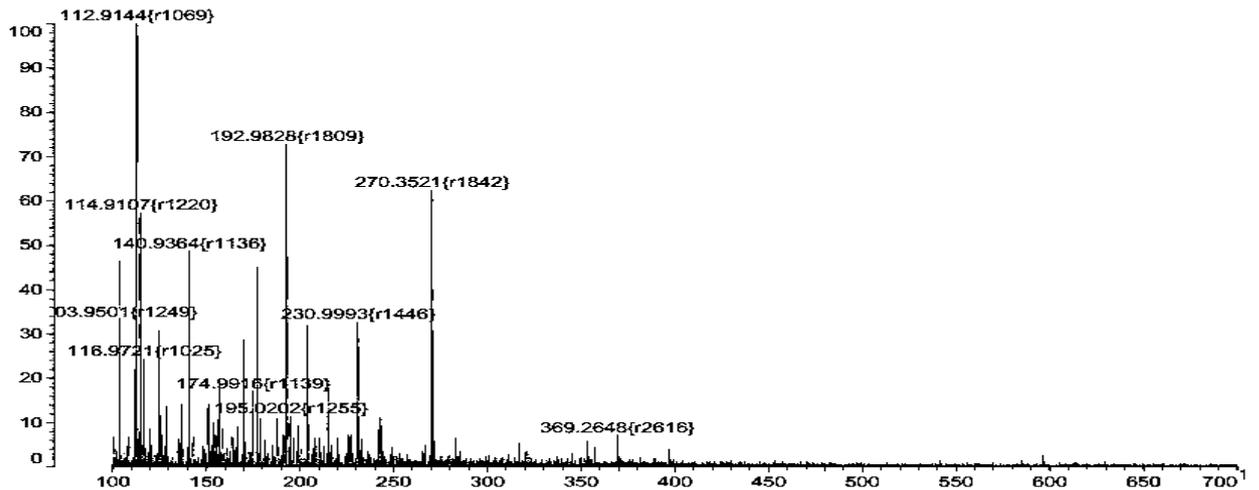


Рисунок 2 — спектр молекулярной массы фрагментов макромолекул *L.acidophilus*, определенных методом MALDI TOF для одного из экспериментов (матрица 2,5-дигидроксибензойной кислоты - ДНВ)

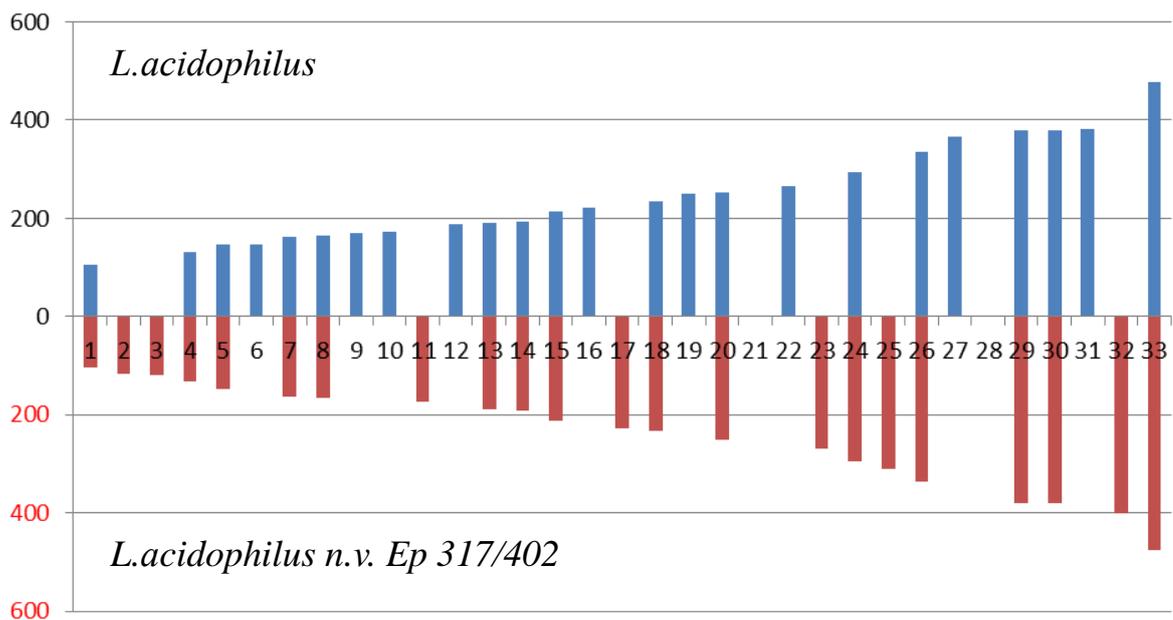


Рисунок 3 — сравнение спектров молекулярной массы фрагментов макромолекул штаммов *L.acidophilus* и *L.acidophilus n.v. Ep 317/402*, определенных методом MALDI TOF с использованием в качестве матрицы СНСА

Для удобства восприятия и сравнения полученных спектров по конкретным экспериментам нами был выполнен сравнительный анализ с использованием графического представления полученных

экспериментальных данных в виде одномасштабных гистограмм (Рисунок 3 и Рисунок 4).

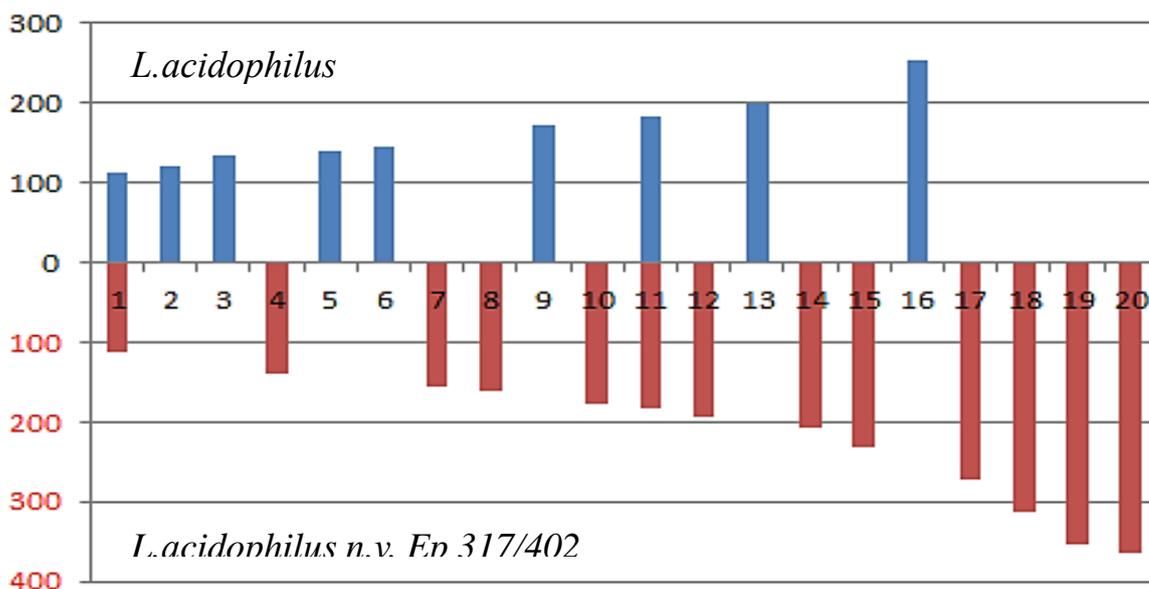


Рисунок 4 – сравнение спектров молекулярной массы фрагментов макромолекул штаммов *L.acidophilus* и *L.acidophilus n.v. Ep 317/402*, определенных методом MALDI TOF с использованием в качестве матрицы DHB

Они однозначно свидетельствуют о большей информативности спектрального представительства $M_{\text{ФМ}}$ с использованием в качестве матрицы СНСА. Причем при использовании в качестве матрицы СНСА чаще наблюдается полное совпадение $M_{\text{ФМ}}$ в получаемом спектре пролетной масс-спектрометрии. Это позволяет сделать вывод о возможности использования данной матрицы при оценке специфических признаков для *L.acidophilus*, полученных из различных пробиотических препаратов. Подобного совпадения при использовании матрицы DHB для *L.acidophilus* не наблюдается, что не дает возможности дальнейшего использования ее в наших исследованиях (Рисунок 4). На рисунке 5 показано сравнение спектров молекулярной массы фрагментов макромолекул *L.acidophilus*, определенных методом MALDI TOF.

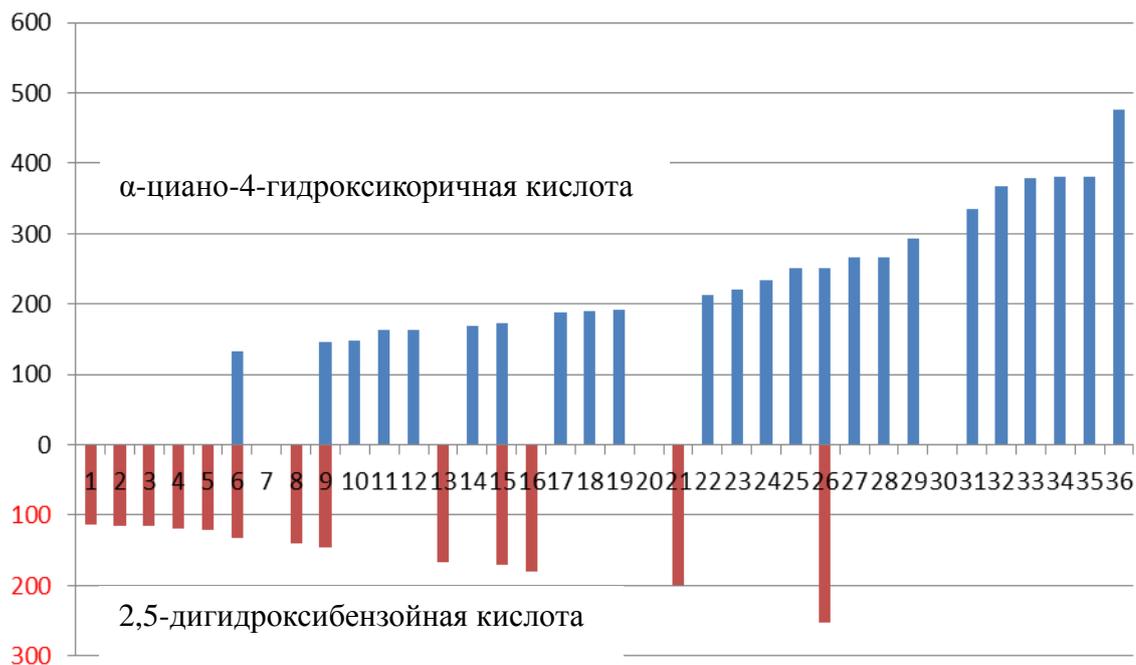


Рисунок 5 — сравнение спектров молекулярной массы фрагментов макромолекул *L. acidophilus*, определенных методом MALDI TOF

Получение плодовых тел и сока гриба Шиитакэ

Для оценки воздействия сока Шиитакэ как источника биологически активных веществ, обладающих одновременно антимикробным и стимулирующим действием на клетки лактобацилл *in vitro* при микрокультивировании предварительно мы получали плодовые тела гриба Шиитакэ. В работе нами использовались различные микологические приемы в культивировании гриба Шиитакэ.

Объект исследования - *Lentinus edodes (Shiitake)* – штамм F 280, получен от Tim Straub компания Pillsbury, Minnesota, USA. Гриб выращен в лабораторных условиях на субстрате из дубовых опилок с добавлением ячменя по технологии интенсивного выращивания плодовых тел грибов (Патент: Способ выращивания мицелия высших грибов А.С.Н 2101914 Бюл. изоб. N2 от 20.01.1998; Патент: Способ бестарного выращивания высших грибов А.С.Н 2101913, Бюл. изоб. N2, 20.01.1998). В процессе роста мицелия гриба на этапе зарастания субстрата были сформированы плодоносящие блоки. Блоки помещали на выгонку плодовых тел в соответствующие

оптимальным жизненным потребностям условия по влажности, температуре (26°C) и вентиляции [124].

После появления зачатков плодовых тел и прохождения этапа образования примордиев грибам давали время полностью сформироваться и раскрыть шляпки. При этом шляпки плодовых тел достигали размеров в среднем 15-18 см. Блоки давали три генерации плодовых тел с интервалом в 14 дней. Сформировавшиеся плодовые тела срезали, измельчали в гомогенизаторе до кашицеобразного состояния, выжимали сок. Сок стерилизовали механическим способом, пропуская через бактериальный фильтр (каолиновые свечи Шамберлена) с размером пор 0,22 мкм. В работе использовали свежий сок гриба Шиитаке.

Стандартизацию сока, полученного из плодовых тел гриба Шиитаке, проводили по уровню нитратов, в работе использовался сок при уровне $\text{NO}_2 - 0,182 \pm 0,032$ ммоль/л.

Термическую обработку проводили на водяной бане при 100°C в течение 20 минут. В результате термической обработки выпадал осадок, в последующих экспериментах использовали надосадочную фракцию сока. Субстратный мицелий (вегетативная фаза роста мицелия) получали глубинным культивированием в колбах в течение трех дней в жидкой питательной среде - 10% пивное сусло.

Полученный субстратный мицелий отмывали от питательной среды трехкратным центрифугированием в растворе 0,9% NaCl и затем гомогенизировали. Культуральную жидкость отбирали через 14 дней глубинного культивирования мицелия гриба Шиитаке. Из среды удаляли агаровые частицы путем фильтрации через четырехслойные марлевые фильтры.

Использование чистых жидких культур грибов способно дать новый толчок к развитию грибоводства, поскольку интерес к промышленной выгонке грибов остается практически постоянным. Однако следует помнить,

что это специальное биотехнологическое производство, нуждающееся в постоянном контроле по качеству и персональному наполнению.

Статистические методы исследования

Статистическую обработку данных осуществляли с применением параметрических и непараметрических методов с использованием пакета статистических программ: Excel (Windows 2007), Statistica 13, в частности по критерию Стьюдента.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

Где \bar{X}_1 и \bar{X}_2 – средние значения (математические ожидания) исследуемых выборок, s_1^2 и s_2^2 – стандартные отклонения, N_1 и N_2 – объемы выборок.

t – наблюдаемое значение критерия Стьюдента для выборок с разными объемами.

$T_{кр}$ исходя из уровня значимости и количества степеней свободы: $T_{кр}=2,02$ при $p<0,05$; $T_{кр}=2,7$ при $p<0,01$; $T_{кр}=3,55$ при $p<0,001$;

В случае, если $|t| > T_{кр}$ - гипотеза о равенстве выборочных средних отвергается (различие между выборочными средними – достоверно).

(Г.Ф. Лакин, Биометрия. Издательство «Высшая школа», 1973).

Достоверность различий между средними показателями рассматривались как значимые при $p<0,05$. Для вариационных рядов рассчитывали коэффициент вариации (CV) по формуле: $CV = 100*(\sigma/x_{cp.})\%$.

Анализ спектров осуществлялся с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. Учитывали значения, рейтинг которых составлял $\geq 1,7$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. Культивирование микроорганизмов в различных условиях методом микрокультивирования и чашечным методом

3.1. Выбор оптимального информативного показателя для характеристики начальных этапов развития бактериальных популяций в процессе микрокультивирования

При изучении развития микроорганизмов на клеточном уровне используется метод микрокультивирования с использованием светового микроскопа в различных режимах наблюдениях (фазовоконтрастном, темного или светлого поля, поляризационного освещения и др.).

Данный метод подразумевает использование специальных микрокамер для прижизненного наблюдения изучаемых штаммов микроорганизмов, а сам процесс культивирования обычно выполняют в стационарном и проточном режимах. Таким способом можно исследовать развитие бактериальных и микологических культур микроорганизмов.

Наибольшее распространение метод микрокультивирования получил с использованием светового микроскопа при изучении развития бактериальных культур. Связано это, скорее всего, с быстрым ростом бактериальных клеток как объекта исследования, что позволяет закончить экспериментальное наблюдение в течение одного дня. Однако в связи с малыми размерами наблюдаемых клеток, сложностями визуализации морфологического состояния клеток (возможного полиморфизма в процессе роста), а также чрезвычайно широкой вариабельности в этапах прохождения жизненного цикла отдельными клетками исследуемой популяции микрокультивирование как метод исследования все-таки не нашел широкого применения в микробиологических исследованиях.

Существуют также и другие сложности выполнения данного вида научных исследований. К ним относятся, в том числе отсутствие общепринятых объективных критериев (показателей), способных при

множестве дискретных изучаемых биологических объектов (клеток) данной популяции охарактеризовать достаточно быстро направленность протекания адаптивного процесса.

В качестве объекта исследования были использованы штаммы клеток *Shigella flexneri S-50* и *Shigella flexneri Rd* из международной коллекции Simmons'a. Культивирование клеток для изучения особенностей адаптивного поведения популяции на начальных этапах формирования микроколоний осуществляли в стационарных микрокамерах двух разновидностей: Пешкова М.А. и стационарной камере диффузного типа (СКДТ) Кузнецова О.Ю., а также проточной Кузнецова О.Ю.

В ходе приготовления камеры Пешкова к работе использовали мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ) Несинхронизированный бактериальный клеточный инокулят для размещения в микрокамеру брали из популяции в стационарной фазе развития, выращенной на жидкой питательной среде указанного выше состава в течение 18 часов.

Для наблюдения и регистрации роста бактериальных клеток нами использована микрокиноустановка МКУ-1. Микрокамеру после сборки (подготовки к работе) помещали в термостолмик микрокиноустановки МКУ-1 при температуре 37°C ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Цейтраферная микрокиносъемка продолжалась в течение 8 часов на пленку «Микрат-300» с временной регистрацией 1 кадр/10 минут в фазовом контрасте. Фотоотпечатки (24x30 см) получали на контрастной бумаге. На первом фотоотпечатке (начальном снимке в серии) всем клеткам в поле зрения присваивали свои порядковые номера, которые сохраняли и за клетками-потомками. Для каждой клетки в поле зрения определяли момент окончания клеточного цикла и рассчитывали индивидуальное время генерации (τ).

В ходе изучения развития бактерий в микрокамере исходно можно получить довольно мало первичной информации. Эта информация касается в первую очередь морфологии клеток – определяли их длину и диаметр в

начале и конце клеточного цикла (L_0 , L_k , d_0 , d_k), а также τ конкретных клеток. На основе измерений всех этих вышеуказанных параметров рассчитывали также несколько формализованных информативных показателей, которые могут характеризовать свойства как отдельных клеток, так и бактериальной популяции в целом:

L_0 – начальная длина клетки; L_k – конечная длина клетки перед делением, τ – время генерации; 0,4343 – коэффициент пересчета \ln в \lg . Формула получена путем простых преобразований формулы экспоненциального роста бактериальной клетки.

- L_k/L_0 – соотношение длины клетки в конце и начале роста, характеризующее степень соответствия среды жизненным потребностям клетки. Палочковидную бактерию обычно представляют в виде цилиндра с гемисферическими полюсами, а ее площадь поверхности и объем рассчитывают по формулам: $S = 2\pi * r L$ (мкм²); $V = \pi * r^2(L - 2/3r)$ (мкм³), L – длина бактерии, r – радиус, равные половине ее толщины; d_0 и d_k – начальный и конечный диаметр клетки.

- C – скорость роста, которая рассчитывается по формуле с учетом времени генерации клеток:

$$C = \frac{\lg L_k/L_0}{0.4343 * \tau}$$

- S_0, S_k – начальная и конечная площадь поверхности клетки в цикле роста, характеризующая потенциальную возможность интенсивности роста.

- V_0, V_k – начальный и конечный объем клетки в цикле роста, характеризующий индивидуальную биомассу клетки при условии неизменности роста.

- $S_0/V_0, S_k/V_k$ – отношение начальной и конечной площади поверхности клеток к ее объему. Характеризует возможную интенсивность жизнедеятельности.

Для оценки влияния конструктивных особенностей микрокамер на развитие и адаптивные процессы, происходящие с бактериальными клетками, был выполнен эксперимент со штаммом шигелл *S.flexneri Rd*, имеющим неполный липополисахарид оболочки. Наличие такой структуры липополисахарида могло определять широкий разброс поведенческих реакций клеток бактериальной популяции, что неизбежно должно было отразиться на регистрируемых показателях. Полученные данные по характеристикам развивающихся клеток штамма *S.flexneri Rd* с использованием стационарных и проточной микрокамер различной конструкции представлены в таблице 1.

Установлено, что для камер стационарного типа наблюдаются достоверные отличия по всем исследованным показателям в наблюдаемых поколениях клеток (P1: *- ***). Эти отличия носят несовпадающий характер как по значениям, так и по тенденциям изменений, вследствие чего объяснить полученные данные не представляется возможным. Однако обнаружено, что наиболее совпадающим по значениям параметром является τ клеток второго поколения.

Только в данном случае отличия полученных данных по критерию Стьюдента не выявлены (#). Именно это позволяет говорить о том, что процессы, характеризующие развитие популяции клеток во втором поколении, совпадают, и поэтому показатель τ является ведущим для оценки физиологического состояния.

Камера проточного типа (камера Кузнецова) характеризуется существенным отличием данных по всем показателям в исследованных поколениях клеток (по сравнению с конструктивно схожей СКДТ – камера Кузнецова), что свидетельствует об особых условиях роста клеток в условиях повышенной реологии среды культивирования (P2: * -*** Таблица 1).

Таблица 1 — Морфофункциональные показатели клеток *Shigella flexneri* Rd в микроскопических камерах различной конструкции

Показатель	Поколения клеток	Среднее значение показателей $M \pm m$				
		Камера Пешкова $N_I - 43;$ $N_{II} - 70$	Стационарная камера диффузного типа (камера Кузнецова) $N_I - 56;$ $N_{II} - 104$	P_1	Проточная камера (камера Кузнецова) $N_I - 62;$ $N_{II} - 82$	P_2
Lo (мкм)	I	2,04±0,05	2,62±0,08	***	1,98±0,06	***
	II	2,22±0,08	2,04±0,04	*	2,18±0,04	**
Lk (мкм)	I	4,50±0,08	3,88±0,08	***	3,86±0,11	*
	II	3,46±0,09	3,72±0,06	**	4,75±0,49	*
do (мкм)	I	1,04±0,02	1,35±0,03	***	0,99±0,02	***
	II	1,19±0,04	1,06±0,04	*	0,98±0,02	*
dk (мкм)	I	1,52±0,03	1,38±0,03	***	1,00±0,02	***
	II	1,51±0,05	1,24±0,03	***	1,07±0,1	***
Lk/Lo	I	2,23±0,03	1,51±0,02	***	2,07±0,04	***
	II	1,58±0,02	1,86±0,02	***	2,28±0,12	***
τ (мин)	I	221±3	194±5	***	145±7	***
	II	132±5	145±6	#	95±4	***
$C \cdot 10^3$	I	3,63±0,06	2,06±0,04	***	4,64±0,10	***
	II	3,53±0,11	4,26±0,07	***	7,45±0,06	***
So (мкм ²)	I	6,52±0,09	12,08±0,21	***	6,07±0,12	***
	II	8,58±0,24	7,07±0,12	***	6,71±0,08	**
Sk (мкм ²)	I	21,64±0,70	18,38±0,28	***	12,30±0,53	***
	II	16,66±0,89	15,74±0,51	**	13,14±0,14	***
Vo (мкм ³)	I	1,40±0,07	3,54±0,09	***	1,27±0,09	***
	II	2,22±0,21	1,60±0,11	***	1,45±0,03	**
Vk (мкм ³)	I	7,41±0,36	2,22±0,02	***	2,88±0,19	***
	II	5,45±0,50	4,58±0,27	***	3,02±0,05	***
So/Vo	I	4,80±0,08	3,48±0,03	***	5,10±0,09	***
	II	4,23±0,15	4,61±0,12	*	4,92±0,03	**
Sk/Vk	I	2,29±0,05	8,24±0,08	***	4,54±0,10	***
	II	3,23±0,10	3,53±0,09	***	4,52±0,05	***

Примечание: достоверность (P) отличия результатов
 P_1 – Камера Пешкова – Стационарная камера диффузного типа (камера Кузнецова)
 P_2 – СКДТ – камера Кузнецова – Проточная камера
N – Количество клеток

* - $P < 0,05$

** - $P < 0,01$ *** - $P < 0,001$ # - отличия не выявлены

Из-за обнаружения столь различных данных, характеризующих развитие клеток *S.flexneri* Rd, мы сочли необходимым проверить информативность и вероятность повтора данных показателя τ для штамма *S.flexneri* S-50. Клетки этого штамма обладают полноценным липополисахаридом клеточной стенки, что может дать однотипную реакцию клеток в сходных условиях культивирования при использовании стационарных микрокамер.

Согласно полученным результатам при использовании штамма *S.flexneri* S-50 определено (Таблица 2), что среднее значение τ клеток в стационарной камере типа Пешкова и в камере Кузнецова для I поколения значительно отличаются (P - ***). Так, τ клеток I поколения составляет 205 ± 3 минут, т.е. $M \pm m$, а в стационарной камере диффузного типа (камера Кузнецова) τ клеток I поколения – 259 ± 6 минут, т.е. $M \pm m$. Вместе с тем τ клеток II поколения в использованных камерах практически совпадают (110 ± 3 минут и 119 ± 3 минут, т.е. $M \pm m$ – камеры Пешкова и камера Кузнецова соответственно). Достоверных отличий в этом случае не выявлено – P - #.

Значительную разницу по τ клеток I поколения *S.flexneri* S-50 в стационарных микрокамерах различной конструкции можно объяснить тем, что в камере Пешкова клетки уже включились в активный рост до начала регистрации процесса. Это происходит вследствие того, что приготовление (сборка) камеры к работе предполагает внесение клеточного инокулята на поверхность полноценной питательной среды на длительное время. Увеличение τ клеток I поколения в камере Кузнецова можно объяснить также некоторыми особенностями диффузионных процессов, вызванных предварительным размещением засеваемых клеток инокулята на диск «голодного агара», что вызвало вероятный сбой и некоторую задержку по времени в прохождении клеточного цикла либо привнесением вместе с клетками 18 часового инокулята аутоингибиторов, принимающих участие в

«кворум сенсинге» [16] на стационарной фазе развития микробной популяции.

Разница во времени генерации клеток II поколения в микрокамерах стационарного типа практически отсутствует при одинаковых значениях ошибки средней. Это может свидетельствовать о том, что процессы, происходящие в камерах различной конструкции в течение прохождения клетками популяции *S.flexneri* S-50 второго поколения, полностью идентичны. Наличие некоторой разницы (в 9 минут) по средним значениям τ для использованных типов микрокамер можно считать несущественной, так как сроки временных срезов в регистрации процесса развития клеток между отдельными снимками составляет 10 минут.

Таблица 2 — Особенности развития клеток *Shigella flexneri* S-50 в микрокамерах стационарного типа

Показатель	Поколения клеток	Средние значения показаний $M \pm m$		
		Стационарная камера типа Пешкова	Стационарная камера диффузного типа (камера Кузнецова)	P
		$N_I-56, N_{II}-106$	$N_I-57, N_{II}-117$	
Время генерации клеток (τ , мин)	I	205 ± 3	110 ± 3	***
	II	110 ± 3	119 ± 4	#

Примечание: * - $P < 0,05$ ** - $P < 0,01$ *** - $P < 0,001$ # - отличия не выявлены

Обычно использование микрокамер ограничивается получением разовых временных снимков развития бактериальных клеток от одиночных клеток до состояния микроколоний. Лишь в некоторых работах [41, 84] есть количественные оценки морфофизиологического состояния бактериальных клеток в процессе микрокультивирования. В ходе получения информации о

развитии клеток в этих работах выполнялось микрофотографирование бактерий в режиме длительной цейтраферной съемки.

В целом этот процесс до использования цифровых фото и видеокамер, а также компьютерной техники характеризовался крайне большой инертностью в получении информации и высокой степенью вероятных рисков, возможной потери информации вследствие непредвиденных технических проблем как в процессе фотосъемки, так и при фотографической печати полученных снимков.

Однако выбор информационных показателей, характеризующих начальные стадии процесса адаптации, является прерогативой исследователя и определяется конкретными задачами его научного исследования. До настоящего времени было мало предпринято практических попыток унифицировать научные подходы исследования начальных стадий развития бактериальных культур на популяционном уровне при использовании микрокамер.

При анализе данных методов изучения микробных популяций следует особо акцентировать, что оба этих метода являются очень трудоемкими, а одним из ведущих показателей, используемых для оценки физиологических процессов, происходящих с клетками, является их время генерации.

Для прохождения биологических процессов всецело важным является время жизни данного биологического объекта: клетки, ткани (совокупности клеток), что в первом приближении может быть рассмотрено как примитивный целостный организм. Такой подход имеет право на существование, если не вдаваться в подробности регуляции взаимодействия клеток между собой, а также моменты регуляции жизнедеятельности всего организма. Существование сложных механизмов регуляции у бактерий при увеличении их количества до этапа формирования структур, сходных с тканевыми структурами вышестоящих многоклеточных организмов считается сейчас уже доказанным фактом – дистантное взаимодействие клеток [42, 43], кворум-сенсинг [16].

Поиски зависимости морфологических характеристик и времени их формирования лишь подтверждают необходимость еще раз более пристально взглянуть на закономерности прохождения временных процессов в биологических объектах и в микробных популяциях в частности.

Пространство в микробиологических исследованиях редко принимается во внимание, поскольку размеры (объемы) питательной среды, плотной или жидкой, многократно превосходят возможности ее биологического усвоения данной популяцией за короткий период времени исследования. Происходит это вследствие того, что человек, как исследователь, оперирует своими линейно-объемными масштабами, значительно превышающими размерности микромира. Даже столь малые по объемам, с точки зрения человека, запасы питательной среды в стационарной микрокамере позволяют обеспечить нормальный рост клеток бактериальной культуры в течение наблюдаемого периода эксперимента.

Неважно, по каким параметрам регистрации происходит измерение и оценка воздействия фактора на биологический объект. Самым важным, окончательно существенным параметром, на наш взгляд, является время протекания (прохождения) биологических процессов.

Ускорение данного процесса может быть расценено как наличие в данный период физического времени наиболее оптимальных условий, а замедление (вплоть до перехода в состояние покоя) – как неблагоприятное воздействие. В этом случае физическое конвенционное понятие времени приобретает смысл физиологического показателя, способного довольно объективно оценить процесс адаптации клеток к среде обитания.

Зарегистрировать это в условиях микрокультивирования достаточно трудно, но реализуемо. И в этом случае нет необходимости отслеживать для клеток популяции их линейные размерные характеристики роста (длину, диаметр), поскольку время генерации интегрально отражает всю сумму биологических процессов, происходящих в популяции клеток. В данном случае существенное значение на популяционном уровне приобретает

суммарное усредненное время генерации для клеток. Это позволяет определить вектор направленности адаптивного процесса в популяции клеток: ускорение протекания биологического времени или тенденции к его замедлению.

1. Наиболее оптимальным и интегральным показателем для оценки физиологического состояния клеток бактериальных популяций может быть использовано τ , рассчитываемое для первых двух поколений клеток.

2. Оценку физиологического состояния клеток и клеточных популяций в микрокамерах следует проводить, регистрируя и особо акцентируя внимание на адаптивном поведении клеток второго поколения, которое результируется только в одном показателе – времени генерации (τ).

3. Установлено, что конструктивные особенности стационарных камер не оказывают существенного воздействия на адаптивное поведение клеток шигелл на ранних стадиях развития.

4. Обнаружено, что условия проточного микрокультивирования бактериальных клеток являются уникальными вследствие повышенной реологии среды культивирования.

С учетом вышеизложенного нами был отобран один показатель для оценки физиологического состояния бактериальных клеток. Оценку состояния клеточных популяций следует проводить, регистрируя время генерации для первых двух поколений.

3.2. Микрокультивирование пробиотических штаммов лактобацилл в оптимальных условиях среды

Для определения и установления контроля времени генерации лактобацилл мы использовали штаммы: *Lactobacillus acidophilus*, *L.rhamnosus LGG*, *L.casei DN-114001 defensis*, *L.acidophilus NK 1 ГКНМ №175*, *L.rhamnosus* и *L.casei*. Каждый изучаемый методом микрокультивирования штамм лактобацилл культивировали в аналогичных условиях постановки эксперимента трижды.

Во время постановки эксперимента методом микрокультивирования использовали стационарную камеру диффузного типа (СКДТ).

Наблюдали за первыми двумя поколениями бактериальных клеток в независимом тройном эксперименте. Установлено, что для всех проделанных экспериментов (Таблица 1) наблюдаются достоверные отличия по времени генерации (τ) I поколения (P_1 - ***, $P < 0,001$). Эти отличия носят несовпадающий характер как по значениям, так и по тенденциям изменений, вследствие чего объяснить полученные данные не представляется возможным.

Однако обнаружено, что наиболее совпадающим по значениям параметром является τ клеток второго поколения. Только в данном случае отличия по значениям полученных данных не выявлены (#). Это позволяет говорить о том, что процессы, характеризующие развитие популяции клеток во втором поколении, совпадают для всех выполненных нами экспериментов.

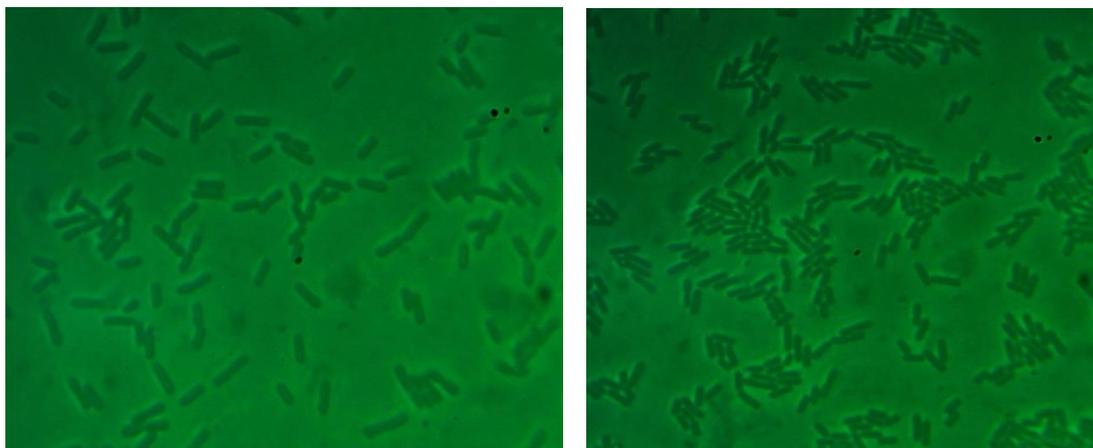
Это свидетельствует об абсолютной воспроизводимости и совместимости полученных данных для выполненных нами независимых экспериментов. Именно вследствие этого в дальнейшей работе мы сочли возможным и достаточным использовать данные одного из выполненных нами экспериментов тройной повторности.

На рисунке 6 представлены отдельные фазы микрокультивирования популяции клеток лактобацилл штамма *L.acidophilus* в оптимальных условиях культивирования с использованием среды лактобакагар. В эксперименте была использована стационарная камера диффузного типа.

В экспериментах с использованными нами штаммами лактобацилл установили время генерации клеток (τ) в оптимальных условиях культивирования для первых двух поколений (Таблица 3).

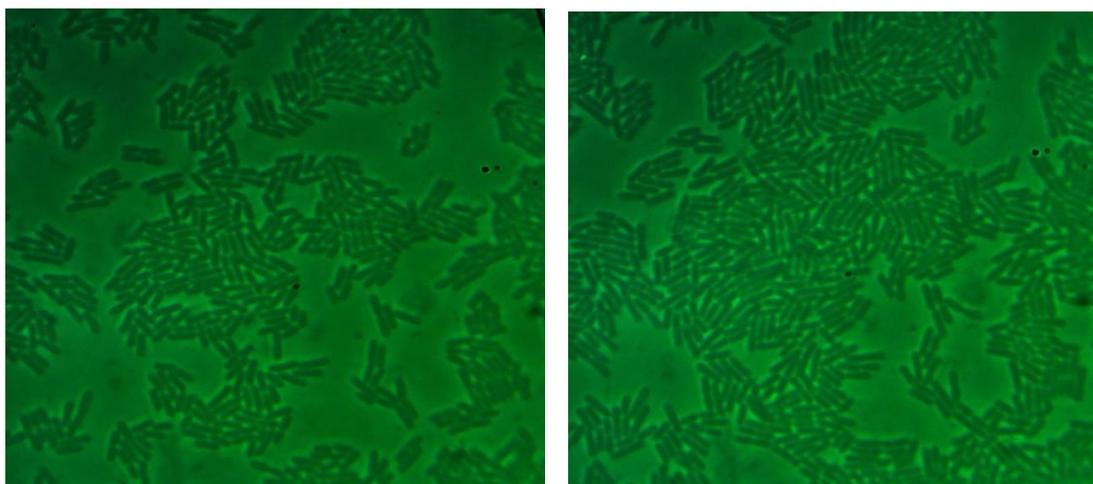
Полученные данные могут свидетельствовать о том, что клетки лактобацилл, попавшие в новую питательную среду, находятся на различных этапах клеточного цикла (начало ÷ конец). Так, оказалось, что время деления клеток I поколения находится в довольно широком временном диапазоне, от

89 до 269 минут для *L.casei* DN-114001 *defensis* и *L.rhamnosus* LGG соответственно.



А) 30 мин.

Б) 120 мин.



В) 240 мин.

Г) 360 мин.

Рисунок 6 — Развитие популяции клеток штамма *Lactobacillus acidophilus* (цейтраферная микрофотосъемка в фазовом контрасте, время культивирования – 6 часов, эксперимент №35), увеличение $\times 2500$

Установлено, что для исследуемых штаммов лактобацилл наблюдаются достоверные отличия только одного определяемого параметра – времени генерации I поколения клеток (P_1 : $<0,01$, $<0,001$, отличия не выявлены). Установлено, что разброс по данным времени генерации носил

индивидуальный характер для изучаемых штаммов лактобацилл. Это легко объясняется тем фактом, что неизвестно, на какой стадии прохождения клеточного цикла находились клетки изучаемого штамма в момент попадания их на поверхность плотной питательной среды в камере культивирования. Кроме того, мы брали для всех экспериментов несинхронизированный клеточный инокулят.

Полученные нами данные подтверждают наличие физиологической гетерогенности исследованных популяций клеток лактобацилл, что может рассматриваться как адаптивный признак, повышающий устойчивость популяции к возможным негативным воздействиям факторов окружающей среды.

Однако регистрируемое время генерации II поколения является примерно одинаковым, поскольку полученные результаты отличаются недостоверно (P_2 - # отличия не выявлены). Это позволяет говорить о том, что процессы, характеризующие развитие популяции клеток во втором поколении, совпадают для различных штаммов, взятых в данный эксперимент.

Таким образом, наиболее близким и стабильным по значениям параметром, согласно полученным данным, является τ клеток второго поколения. Отличия полученных данных для конкретного штамма в нескольких экспериментах по критерию Стьюдента не выявлены.

Именно это позволяет говорить о том, что процессы, характеризующие развитие популяции клеток во втором поколении, у каждого штамма индивидуальны и в целом совпадают в сходных условиях различных экспериментов, и поэтому время генерации (τ) является ведущим показателем для оценки физиологического состояния для различных штаммов лактобацилл при микрокультивировании.

Таблица 3 — Микрокультивирование лактобацилл в оптимальных условиях

Штамм	Эксперимент	I поколение			II поколение		
		τ (мин) среднее	ст. откл.	N_I	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_{II}
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	193±9	47	30	123±3	13	60
	2	208±7	41	30	118±3	21	56
	3	253±9	48	30	111±2	16	58
Достоверность	P	1-2 отличия не выявлены 1-3 <0,001 2-3 отличия не выявлены			1-2 # 1-3 # 2-3 # отличия не выявлены		
<i>L. rhamnosus LGG</i>	1	155±10	52,1	29	127±3	15	58
	2	269±9	46,1	28	121±3	20	50
	3	190±8	45	30	128±4	18	59
Достоверность	P	1-2 отличия не выявлены 1-3 <0,01 2-3 <0,001			1-2 # 1-3 # 2-3 # отличия не выявлены		
<i>L. casei DN-114001 defensis</i>	1	89±6	35	30	132±2	14	60
	2	110±7	38	30	135±2	15	60
	3	117±7	36	30	136±2	13	60
Достоверность	P	1-2 <0,05 1-3 <0,01 2-3 отличия не выявлены			1-2 # 1-3 # 2-3 # отличия не выявлены		
<i>L. acidophilus NK1</i>	1	201±8	44	30	159±2	12	56
	2	210±9	45	30	155±2	12	60
	3	256±8	40	30	157±2	14	30
Достоверность	P	1-2 отличия не выявлены 1-3 <0,001 2-3 <0,001			1-2 # 1-3 # 2-3 # отличия не выявлены		
<i>L. rhamnosus u L. casei</i>	1	176±9	52	30	143±2	14	60
	2	189±8	50	30	144±2	12	60
	3	190±8	53	30	141±2	13	59
Достоверность	P	1-2 отличия не выявлены 1-3 отличия не выявлены 2-3 <0,01			1-2 # 1-3 # 2-3 # отличия не выявлены		

Примечание: τ (мин) – время генерации; N_I , N_{II} – количество клеток

* - P <0,05

- отличия не выявлены

** - P <0,01

*** - P <0,001

Выполненные эксперименты по микрокультивированию лактобацилл позволяют сделать вывод о возможном количественном сравнении полученных данных физиологического состояния популяции на клеточно-популяционном уровне в различных экспериментах, что способствует расширению наших представлений о развитии микробной культуры на самых ранних стадиях ее развития до образования сплошной биопленки изучаемого вида на поверхности плотной питательной среды.

3.3. Микрокультивирование лактобацилл (на примере *L.acidophilus*) совместно с отдельными видами микроорганизмов микробиоты тела человека

Культивирование и изучение воздействия различных факторов абиотической и биотической природы осуществляют при оценке развития только одной микробной культуры. Однако микроорганизмы никогда не встречаются в пределах одного биотопа в чистой культуре, там обязательно присутствуют другие микроорганизмы, способные оказать воздействие на развитие этой культуры.

Известно, что пробиотические бактериальные препараты должны обладать антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий. Однако в доступной нам литературе найдено мало данных о возможном обратном действии условно-патогенных микроорганизмов на пробиотические лактобациллы.

Нами был выполнен эксперимент по проверке биосовместимости условно-патогенной кишечной микробиоты и пробиотических лактобацилл. Трудность выполнения данного эксперимента определяется тем, что для проверки биосовместимости тестируемые штаммы должны расти совместно на одной и той же питательной среде. Кроме того, в микрокамере создаются специфические условия по особенностям протекания аэробно-анаэробного процесса, которые в значительной степени могут определить развитие тех или иных штаммов микроорганизмов.

Для постановки опыта использовали лактобакагар, MRS и сахарный бульон. Штамм лактобацилл *L.acidophilus* был выделен из состава пробиотического препарата «Лактобактерин» производства «Биомед» ОАО им. И. И. Мечникова. В качестве представителей условно-патогенной микробиоты были взяты штамм грибов рода *Candida* и штамм *S.aureus*.

Эксперимент был поставлен следующим образом: первоначально в отдельные пробирки со средой засеивали штаммы культур *L.acidophilus*, *Candida sp.* и *S.aureus*, которые культивировали в термостате при температуре 37⁰С в течение 18 часов. Затем готовили СКДТ: на тонкий диск лактобакагара засеивали бактериальной петлей культуру *L.acidophilus*, давали время жидкости впитаться в агар. В это время готовили для эксперимента культуру-индуктор воздействия: 1 мл культуры *Candida sp.* или *S.aureus* брали пипеткой и вносили в стерильную пробирку и добавляли 1 мл сахарного бульона.

После того как жидкость впиталась, диск накрывали покровным стеклом и запечатывали с трех сторон герметизирующей замазкой, с помощью пастеровской пипетки в капиллярную щель между стеклами к слою агара с клетками подводился жидкий питательный бульон с клетками культуры-индуктора: *Candida sp.* или *S.aureus*. Затем готовую микрокамеру помещали в термостоллик (при температуре 37⁰С).

Представленные в таблице 4 результаты позволяют констатировать, что в ходе экспериментов время генерации второго поколения клеток пробиотического штамма *L.acidophilus* не увеличилось под действием клеток грибов рода *Candida*, это говорит о том, что культура *Candida sp.* не оказывает антагонистического влияния на развитие лактобацилл и является биосовместимой с лактобактериями. Вероятней всего, это связано с постоянным присутствием в кишечнике грибов рода *Candida sp.* в норме (ОСТ 91500.11.0004–2003, норма до 10³).

Таблица 4 — Время генерации клеток *L. acidophilus* («Лактобактерин») при совместном микрокультивировании с условно-патогенной микробиотой

Штамм	№ эксп	I поколение			II поколение		
		τ (мин) среднее	ст. откл.	N _I	τ (мин) среднее	ст. откл.	N _{II}
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		193±9	47	30	123±3	13,4	60
<i>L. acidophilus</i> + <i>Candida sp.</i>	1	165±7	36	29	120±3	25	55
	2	146±7	37	30	115±3	21	60
Достоверность	P	1-2 отличия не выявлены			1-2 отличия не выявлены		
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. aureus</i> N-3	1	190±8	43	30	125±4	30	56
	2	219±10	53	30	133±3	24	53
Достоверность	P	1-2 <0,05			1-2 отличия не выявлены		

Примечание: τ (мин) – время генерации; N_I, N_{II} – количество клеток

Проведенные исследования антагонистической активности в экспериментах с *S.aureus* показывают, что время генерации второго поколения лактобацилл незначительно увеличилось под действием выделяемых им ферментов (в пределах интервала видеосъемки - 10 минут). Следовательно, можно говорить о том, что экспериментальный штамм *S.aureus* слабо проявляет антагонизм (или не проявляет его совсем) в отношении исследуемой культуры лактобацилл, поскольку не задерживает рост и развитие клеток *L.acidophilus*.

В связи с вышеизложенными данными в последующем для изучения взаимоотношений (биосовместимости и антагонистической активности) лактобацилл с представителями условно-патогенной микробиоты этот метод нами не был использован.

3.4. Оценка биосовместимости пробиотического штамма *L.acidophilus* и лактобацилл, содержащихся в функциональных продуктах питания методом микрокультивирования

В связи с тем, что в клинической практике используют пробиотики на основе различных видов лактобацилл, было проведено сравнительное исследование антагонистической активности разных лактобацилл, содержащихся в продуктах функционального питания, на *L.acidophilus* из препарата «Лактобактерин» методом микрокультивирования. Это позволило получить количественные данные о возможном совместном культивировании тестируемых штаммов и оценить наличие конкурентного влияния лактобацилл друг на друга.

На диск «голодного агара» наносили клетки *L.acidophilus*, затем в жидкую питательную среду MRS вносили другую культуру лактобацилл: *L.rhamnosus* LGG, *L.casei* DN-114001 *defensis*, *L.acidophilus* NK 1, *L.rhamnosus* и *L.casei* – и культивировали в термостойке при температуре 37⁰С. Далее наблюдали за ростом исследуемой культуры *L.acidophilus* и определяли время генерации бактериальных клеток.

Полученные данные (Таблица 5) позволяют говорить о наличии высокой антагонистической активности штамма *L.rhamnosus* LGG в условиях микрокультивирования, под действием которого время генерации второго поколения *L.acidophilus* из состава препарата «Лактобактерин» увеличилось на 100 минут (с 123±3 минут в контроле до 212±3 минут, М ± m, отклонение 13 и 23 соответственно). Обнаружено среднее антагонистическое воздействие штамма *L.acidophilus* NK1 (161±4 минут, т.е. М ± m), низкое *L.rhamnosus* и *L.casei* (143±2 минут, т.е. М ± m), а *L.casei* DN-114001 *defensis* (129±2 минут, т.е. М ± m) не оказывает никакого влияния на развитие клеток тестируемого штамма *L.acidophilus* в ходе совместного микрокультивирования. Таким образом, установлено, что данные штаммы (*L.acidophilus* и *L.casei* DN-114001 *defensis*) являются полностью

биосовместимыми и могут выращиваться совместно при масштабировании биотехнологических процессов. Причем статистические расчеты показывают, что все изменения признака (времени генерации для клеток изучаемого штамма лактобацилл *L.acidophilus*) отличия не выявлены: число степеней свободы (f) равно 3, парный t-критерий Стьюдента равен 1.83, критическое значение t-критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы составляет 3.18, $t_{набл} < t_{крит}$ изменения признака статистически не значимы $p=0,21$.

Таблица 5 — Время генерации клеток *L.acidophilus* («Лактобактерин») при совместном микрокультивировании с другими штаммами лактобацилл

Штамм	I поколение				II поколение			
	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_I	P	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_{II}	P
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (контроль)	193±9	47	30		123±3	13	60	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i> LGG	247±7	39	27	<0,001	212±3	23	48	<0,001
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. casei</i> DN-114001 <i>defensis</i>	211±8	44	30	отличия не выявлены	129±2	14	58	<0,005
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> NK1	251±7	39	30	<0,001	161±4	27	60	<0,001
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i> и <i>L.casei</i>	178±9	52	30	отличия не выявлены	143±2	14	60	<0,001

Замедление развития клеток исследуемого штамма *L.acidophilus* при совместном культивировании с тест-культурами можно объяснить выделением лактобациллами ингибирующих экзометаболитов в окружающую среду.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что метод совместного микрокультивирования лактобацилл с использованием фазовоконтрастной световой микроскопии позволяет быстро оценивать наличие или отсутствие биосовместимости для изучаемых штаммов.

Кроме того, обнаружено, что лактобациллы из препаратов и продуктов функционального питания обладают различным спектром антагонистической активности в отношении друг друга. В связи с этим необходим тщательный подбор штаммов для совместного использования в лечении нарушений микробиоты кишечника.

3.5. Использование метода микрокультивирования при оценке воздействия природных активных веществ на пробиотические штаммы лактобацилл

Влияние на развитие как отдельных штаммов лактобацилл, так и их ассоциаций, несомненно, оказывает среда культивирования. Зачастую в этой среде могут оказаться биологически активные вещества, способные воздействовать на всю микробиоту кишечника.

Одной из таких известных пищевых добавок в рационе питания человека является интересный и целебный гриб *Lentinus edodes* (Шиитакэ) (Рисунок 7). Он уже был известен в Китае более чем две тысячи лет назад. За счет своих уникальных свойств его можно использовать как профилактическое и лекарственное средство при многих заболеваниях. Кроме того установлено, что грибной сок стимулирует рост нормальной микробиоты [39].

В доступной нам литературе не был отражен вопрос о реакции лактобацилл на биологически активные вещества сока гриба Шиитакэ. Данные вещества обладают одновременно прямым антимикробным и опосредованным воздействием на микробиоту через активацию клеток иммунной системы, в частности способствуя активации фагоцитарной

активности клеточного иммунитета, естественных киллеров, а также повышают синтез интерферонов и провоспалительных цитокинов.



Рисунок 7 — Плодовые тела грибов Шиитаке (*Lentinus edodes*), выросшие на блоках дубовых опилок

В экспериментах использовали пробиотические штаммы *Lactobacillus*: *L.acidophilus*, *L.rhamnosus* LGG, *L.casei* DN-114001 *defensis*, *L.acidophilus* NK1, *L.rhamnosus* и *L.casei*.

В СКДТ, на диск «голодного» агара, наносили клетки исследуемого штамма, затем в питательную среду добавляли сок гриба Шиитаке. Концентрация сока – 2,5% от объема жидкой питательной среды (патент РФ №266173). При внесении сока в среду менее 2,5% стимулирующий эффект на лактобациллы был выражен незначительно. При увеличении концентрации более 2,5% стимулирующий эффект не изменялся. Для оценки избирательности действия компонентов сока Шиитаке использовали добавку в питательную среду – пивное сусло так же в объеме 2,5%. Необходимость внесения в состав питательной среды 2,5% сока Шиитаке

определяется тем, что сок может быть представлен как богатая добавка в среду культивирования [39]. Далее запечатывали микрокамеру и культивировали в термостолке при оптимальных условиях при температуре 37⁰С и определяли время генерации второго поколения.

В результате исследования сравнивали время генерации второго поколения клеток в контроле и с соком гриба Шиитаке, а так же время генерации с пивным суслон. Полученные данные свидетельствуют (Таблица 6), что под действием сока время генерации второго поколения бактериальных клеток сократилось для *L.acidophilus* с 115±3 до 103±1, *L.rhamnosus LGG* с 127±3 до 120±1, *L.casei DN-114001 defensis* с 132±2 до 120±1, *L.acidophilus NK1* с 159±2 до 134±2, *L.rhamnosus* и *L.casei* с 143±2 до 129±1 минут. В среднем время генерации клеток лактобацилл сократилось на 10% относительно контроля.

Результаты, представленные в таблице 6, позволяют сделать вывод о том, что именно биологические компоненты, содержащиеся в соке гриба Шиитаке, обладают избирательным стимулирующим действием на развивающиеся клетки лактобацилл. В пользу данного вывода говорят данные с добавлением в состав среды 2,5% пивного сусла, поскольку в этом случае практически не обнаружено достоверных отличий с экспериментами этой группы.

Таким образом, установлено, что вещества, содержащиеся в соке гриба Шиитаке, оказывают стимулирующее действие (в среднем на 10%) на рост бактерий рода *Lactobacillus*. При этом наблюдается незначительная девиация стимулирующего действия для различных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*.

Обнаружение однотипного стимулирующего воздействия на все взятые в исследование штаммы лактобацилл позволяет высказать предположение, что и на аутоштаммы лактобацилл конкретного индивидуума будет прослеживаться аналогичное действие компонентов сока гриба Шиитаке.

Таблица 6 — Время генерации клеток лактобацилл в ходе микрокультивирования при добавлении сока гриба Шиитаке

Штамм	I поколение				II поколение			
	τ (мин) среднее	ст. откл	P_I	N_I	τ (мин) среднее	ст. откл	P_{II}	N_{II}
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	269±9	46		28	115±3	20		50
<i>L. acidophilus</i> + пивное сусло	228±5	28	<0,001	29	120±1	8	отличия не выявлены	58
<i>L. acidophilus</i> + сок	259±3	15	отличия не выявлены	30	103±1	10	<0,001	60
<i>L. rhamnosus LGG</i>	155±10	52		29	127±3	15		58
<i>L. rhamnosus LGG</i> + пивное сусло	219±7	37	<0,001	29	121±1	10	<0,05	59
<i>L. rhamnosus LGG</i> + сок	194±9	51	<0,001	30	120±1	7	<0,01	60
<i>L. casei DN-114001 defensis</i>	89±6	35		30	132±2	14		60
<i>L. casei DN-114001 defensis</i> + пивное сусло	212±10	37	<0,001	29	125±8	7	<0,01	58
<i>L. casei DN-114001 defensis</i> + сок	249±5	25	<0,001	29	120±1	7	<0,001	58
<i>L. acidophilus NK1</i>	201±8	44		30	159±2	12		56
<i>L. acidophilus NK1</i> + пивное сусло	215±6	34	отличия не выявлены	30	155±3	19	отличия не выявлены	59
<i>L. acidophilus NK1</i> + сок	206±6	32	отличия не выявлены	30	134±2	12	<0,001	58
<i>L. rhamnosus</i> и <i>L. casei</i>	176±9	52		30	143±2	14		60
<i>L. rhamnosus</i> и <i>L. casei</i> + пивное сусло	215±6	34	<0,01	30	140±3	20	отличия не выявлены	59
<i>L. rhamnosus</i> и <i>L. casei</i> + сок	223±4	80	<0,05	30	129±1	9	<0,001	60

Примечание: τ (мин) – время генерации;
 N_I , N_{II} – количество клеток P – достоверность

3.6. Оценка биосовместимости лактобацилл (на примере *L.acidophilus*) с отдельными представителями микробиоты кишечника

По данным экспериментальных исследований было установлено, что одной из причин неэффективности практического использования (лечения)

пробиотических лактобацилл может являться наличие видовой бионесовместимости изучаемых штаммов между собой. Наличие антагонизма лактобацилл как крайней степени бионесовместимости может быть не только в отношении патогенной микробиоты, но и даже в распространении на представителей нормальной микробиоты кишечника.

Подтверждение подобного рода заключений может быть использовано при рациональном назначении препаратов пробиотиков, содержащих лактобациллы. В связи с этим нами проведено изучение биосовместимости и антагонизма штамма лактобацилл из пробиотического препарата «Лактобактерин» на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы (УПМ), входящие в микробиоценоз кишечника.

В работе были использованы штаммы микроорганизмов, входящие в состав микробиоты тела человека (культуры микроорганизмов были взяты из музея кафедры микробиологии и вирусологии ИвГМА): *Escherichia coli* M-17, *Staphylococcus aureus* N-3, *Staphylococcus sp. 1* (*S.albus*), *Staphylococcus sp. 2* (*S.citreus*), грибы рода *Candida*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella sp.*, *Shigella flexneri*, *Salmonella sp.*) и лактобациллы (*L.acidophilus* «Лактобактерин» производства «Биомед» ОАО им. И. И. Мечникова).

В работе применили прямой метод выявления биосовместимости на плотной питательной среде (лактобакагар).

В ходе проделанной работы с использованием прямого метода биосовместимости был выявлен разнообразный спектр взаимоотношений пробиотического штамма *L.acidophilus* с УПМ (тест - культурами) (Рисунок 8).

Установлено, что культура *L.acidophilus* в большинстве случаев проявляет слабый антагонизм к использованным в работе тест-культурам: *Staphylococcus sp. 1* (*S.albus*), *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, грибам рода *Candida*. В то же время штаммы *S.aureus* N-3, *Salmonella sp.*, *E.coli* являются биосовместимыми. Исключение составили *Staphylococcus sp. 2* (*S.citreus*), рост которого на чашке отсутствовал вследствие воздействия

метаболитов культуры *L.acidophilus*. Кроме того, обнаружено ингибирующее действие *Klebsiella sp.* на культуру *L.acidophilus* (Рисунок 8, В-7).

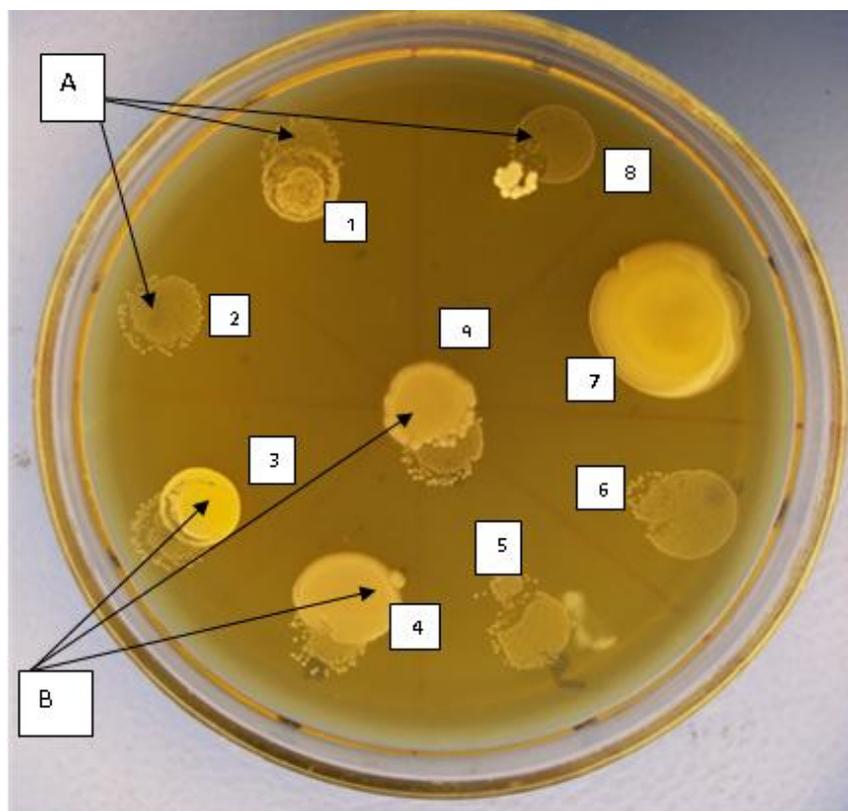


Рисунок 8 — Прямой метод биосовместимости (посев культур микроорганизмов выполнялся последовательно в течение короткого промежутка времени 3-5 минут)

А – исследуемая культура (лактобациллы), проявляющая антагонизм,
В – тест-культуры (условно-патогенные микроорганизмы) под номерами:
1 - *Staphylococcus sp. 1*, 2 - *Staphylococcus sp. 2*, 3 - *S. aureus*, 4 - *Salmonella sp.*,
5 - *Shigella flexneri*, 6 - *Serratia marcescens*, 7 - *Klebsiella sp.*,
8 - грибы рода *Candida*, 9 - *Escherichia coli*.

В связи с тем, что пробиотический штамм *L.acidophilus* обладает слабой антагонистической активностью в отношении транзиторных микроорганизмов, можно предположить, что и другие пробиотические лактобациллы проявляют индивидуальную антагонистическую активность в отношении отдельных представителей кишечной микробиоты.

Обнаружено, что испытуемый штамм лактобацилл *L.acidophilus* не подавляет большинство исследуемых тест-культур, а проявляет по

отношению к ним биосовместимость, а также проявляет чувствительность к *Klebsiella sp.* В связи с этим можно говорить о том, что при совместном культивировании на плотной питательной среде штамм *L.acidophilus* из препарата «Лактобактерин» проявляет слабый антагонизм к УПМ (тест-культурам).

Биосовместимость культур микроорганизмов устанавливается в экспериментах при совместном их культивировании на плотной питательной среде. В данном случае микробные культуры начинают развиваться вместе, выделяя метаболиты, которые и определяют возможность их одновременного сателлитного сосуществования. Однако зачастую метаболиты, которые может выделять микробная культура, могут образовываться на более поздних стадиях высоких концентраций клеток в популяции. Это возможно установить только при выполнении экспериментов по определению наличия антагонизма у микробных культур в отношении друг друга.

3.7. Оценка антагонизма лактобацилл (на примере *L.acidophilus*) с отдельными представителями микробиоты кишечника

Антагонизм лактобацилл в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов оценивали методом отсроченного антагонизма. Культуру лактобацилл *L.acidophilus* предварительно инкубировали на плотной питательной среде в течение 24 часов, затем на поверхность питательной среды с выросшей культурой засеивали тест-культуры микроорганизмов. Далее посеивали в аналогичных условиях так же, как и в методе определения биосовместимости.

При использовании метода отсроченного антагонизма (Рисунок 9) было обнаружено, что под влиянием экзометаболических продуктов *L.acidophilus* ингибированию подвержены 7 из 9 культур (*Staphylococcus sp. 2*, *S.aureus N-3*, *Salmonella sp*, *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella sp*, и *Escherichia coli M-17*), а устойчивость к метаболитам, выделяемым *L.acidophilus*, проявляют лишь грибы рода *Candida* и *Staphylococcus sp. 1*.

Полученные данные дают основание предполагать, что, вероятнее всего, антагонизм проявляет не сама культура, а продукты ее метаболизма. В пользу этого свидетельствует факт наличия непрямого антагонизма пробиотических лактобацилл в отношении представителей микробиоты кишечника за счет выработки метаболитов-ингибиторов. Следовательно, метод отсроченного антагонизма позволяет выявить антагонизм бактерий, в значительной мере обусловленный продукцией экзометаболитов, уровень которых зависит от качественного и количественного состава компонентов питательной среды.

Однако чашечный метод в целом можно представить, как качественный метод, который зачастую не может показать однозначно, насколько культуры микроорганизмов биосовместимы или проявляют антагонизм в отношении друг друга.

Вместе с тем, как мы предполагаем, существует возможность количественного определения явлений биосовместимости или антагонизма при использовании метода микрокультивирования по оценке развития клеток микробной культуры в микрокамерах различной конструкции. Данный подход к исследованию биосовместимости и антагонизма пробиотических штаммов лактобацилл в отношении различных микробных культур или влияния на них веществ различной природы, присутствующих в среде культивирования, не применялся ранее и был предпринят нами в следующем разделе работы.

На начальных стадиях при микрокультивировании обнаружена адаптационная способность бактериальных клеток, которая сохраняется в дальнейшем при масштабировании процесса периодического культивирования. Это позволяет говорить о сохранении процессов кворум-сенсинга от начальных стадий формирования микроколоний до образования клеточных популяций большой численности.

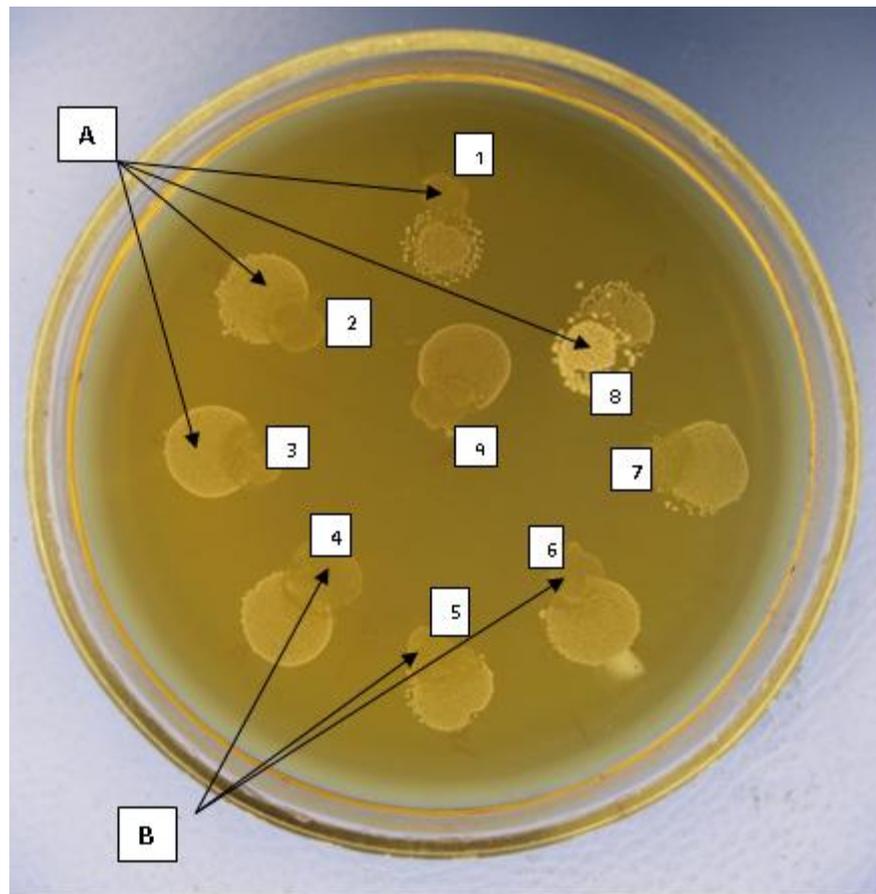


Рисунок 9 — Метод отсроченного антагонизма (посев культур микроорганизмов выполнялся последовательно через сутки)

А – исследуемая культура (лактобациллы), проявляющая антагонизм,

В – тест-культуры (условно-патогенные микроорганизмы) под номерами:

1 - *Staphylococcus sp.* 1, 2 - *Staphylococcus sp.* 2, 3 – *S. aureus*, 4 - *Salmonella sp.*,

5 - *Shigella flexneri*, 6 - *Serratia marcescens*, 7 - *Klebsiella sp.*,

8 - грибы рода *Candida*, 9 - *Escherichia coli*.

Пояснение к Рис.9:

2-7, 9 – явная задержка роста; 1, 8 – тест-культура нечувствительна к исследуемой культуре.

Резюме. В ходе проделанной работы установлено, что оба использованных метода определения биосовместимости и антагонизма (как чашечный, так и метод микрокультивирования) способны оценить биосовместимость и антагонизм различных штаммов микроорганизмов. Однако у этих методов есть как преимущества, так и недостатки в сравнении друг с другом.

При использовании чашечного метода определения биосовместимости и антагонизма обнаружено, что данный метод позволяет провести сравнительную оценку сразу нескольких (до 10 культур) штаммов бактерий после суток совместного культивирования. Однако иногда довольно сложно визуально оценить поведение штаммов микроорганизмов при совместном культивировании. Кроме того, чашечный метод определения биосовместимости и антагонизма является только качественным методом оценки.

После разработки и тестирования определения биосовместимости и антагонизма методом микрокультивирования установлено, что данный метод адекватен и объективен для тестирования различных культур бактерий (в том числе и лактобацилл). Метод микрокультивирования бактерий позволяет получить цифровые (количественные) данные по оценке биосовместимости и антагонизма бактериальных популяций. Особенно это важно при сравнительных исследованиях биологической активности изучаемых микробных популяций. В то же время недостатком этого метода является отсутствие возможности культивирования одновременно более двух культур микробных культур (исследуемой и тест-культуры), а также определенная сложность выполнения процесса микрокультивирования клеточных популяций в особых микроаэрофильных условиях.

При использовании метода микрокультивирования нами было установлено в экспериментах с культурами *S.aureus* N-3 и *C.albicans*, что практически отсутствует влияние условно-патогенных микроорганизмов на лактобациллы из состава пробиотических бактериальных препаратов.

При совместном культивировании штаммов лактобацилл, выделенных из пробиотических препаратов и функциональных продуктов питания (ФПП), установлено, что они обладают различным спектром антагонистической активности в отношении друг друга. Поэтому в дальнейшем для совместного использования в коррекции нарушений

микробиоты кишечника крайне важно тщательно и избирательно подходить к подбору штаммов лактобацилл.

Нами установлено при использовании метода микрокультивирования, что биологически активные вещества сока гриба Шиитакэ стимулируют лактобациллы, это может рассматриваться как положительный фактор при использовании грибов Шиитакэ и их производных в качестве возможных функциональных продуктов питания. Доказательством этому является тот факт, что в соке Шиитакэ содержатся одновременно вещества, которые обладают как антимикробным избирательным действием, так и действием на активацию клеточного иммунитета. Поэтому интересно было установить воздействие на лактобациллы иммунных компонентов слюны человека, обладающих иммунными свойствами.

Это в дальнейшем определило наши последующие исследования с использованием слюны человека как комплекса иммуносодержащих веществ, которые наиболее доступны и безопасны в получении.

ГЛАВА 4. Воздействие антимикробных факторов врожденного иммунитета на отдельные виды микроорганизмов микробиоты тела человека

4.1. Использование метода микрокультивирования в оценке влияния антимикробных факторов защиты слюны на некоторые пробиотические штаммы лактобацилл

Достоверно доказано, что компоненты слюны (секреторный IgA, антимикробные пептиды, комплемент) защищают макроорганизм от чужеродной микробиоты. Степень защищённости слизистых оболочек обусловлена нормальным содержанием секреторного IgA, что коррелирует с титрами антител, образующимися местно, например, в слизистой рта. Последнее обстоятельство препятствует прикреплению инфекционных агентов к эпителию слизистых оболочек. Следовательно, функционально IgA выступает в качестве первой линии защиты на слизистой поверхности, препятствуя проникновению микробов в организм [16].

Механизм действия лизоцима сводится к разрушению гликопротеидов (мурамилдипептида) клеточной стенки бактерий, что ведет к их лизису и способствует фагоцитозу поврежденных клеток. Следовательно, лизоцим обладает бактерицидным и бактериостатическим действием. Кроме того, он активизирует фагоцитоз и образование антител. Комплемент участвует в распознавании, опсонизации, киллинге (лизисе клеток) и элиминации микроорганизмов, иммунных комплексов и разрушенных клеток организма. Однако известно, что представители нормальной микробиоты человека обладают антилизоцимной устойчивостью [11], поэтому основное эффекторное воздействие оказывают IgA.

Наблюдение за отдельными клетками для получения более точных сведений о действии гуморальных факторов врожденного иммунитета (слюны и комплемента) на различные микроорганизмы можно получить, используя микрокамеру с определением времени генерации клеток как совокупного показателя адаптивного поведения развивающихся клеток

популяции. Как было установлено ранее, данный метод микрокультивирования может предоставить достоверные количественные данные об особенностях адаптивного поведения популяции клеток лактобацилл, и особенно это касается анализа данных клеток второго поколения. В этом случае возможно относительно контроля (интактной популяции клеток лактобацилл) оценить влияние на популяцию клеток лактобацилл дестабилизирующего фактора (иммунных компонентов слюны).

До сих пор мало изучено влияние гуморальных факторов врожденного иммунитета, содержащихся в слюне, на рост и развитие производственных штаммов лактобацилл, широко используемых для получения лечебно-профилактических препаратов и ФПП.

Известно, что некоторые лактобациллы активно продуцируют лизоцимоподобный фермент (штаммы *L.acidophilus*, *L.fermentum*, *L.casei*), который оказывает влияние на попавшие извне микроорганизмы [11]. В связи с вышеизложенным нами проведено изучение влияния слюны человека на лактобациллы пробиотических препаратов в стационарной микрокамере.

В эксперименте мы использовали стационарную камеру диффузного типа. На диск голодного агара наносили клетки исследуемого штамма, а в питательную среду, окружающую данный диск с посевом, добавляли «голодную» слюну. «Голодная» слюна была взята натошак у здорового испытуемого за 2 часа до начала проведения эксперимента, предварительно ее центрифугировали и надосадочную жидкость фильтровали через фильтр МФМ-МА с диаметром пор 0,22 мкм, затем добавляли в жидкую питательную среду в равных пропорциях (1:1). Слюну прогревали на водяной бане при температуре 56⁰С в течение 30 минут для разрушения комплемента, чтобы главным неспецифическим фактором защиты остались только лизоцим и секреторный IgA. Проводили трехкратную серию экспериментов. В случае повторения общих закономерностей развития клеток для дальнейшего анализа использовали данные одного эксперимента из этой серии. В следующей серии экспериментов в питательную среду вносили как слюну,

так и комплемент (К) одновременно. В 1 мл среды добавили 0,5 мл слюны и 0,5 мл К. Далее культивировали в микрокамере при необходимых условиях. Выбор и анализ эксперимента для получения данных был аналогичен условиям предыдущей серии экспериментов.

Результаты экспериментов свидетельствуют (Таблица 7), что при добавлении в питательную среду слюны существенного увеличения времени генерации второго поколения не произошло, все в пределах временного интервала 10 минут (промежуточный интервал между фиксированной фотосъемкой), лишь для *L.acidophilus NK1* время деления клеток сократилось с 159 ± 2 мин. до 118 ± 1 мин. (на 41 минуту – отличия статистически достоверны $p < 0,001$). Снижение времени генерации у *L.acidophilus NK1*, возможно, связано с тем, что неспецифические факторы защиты слюны не оказывают антагонистического действия в отношении пробиотических лактобацилл.

Однако привнесение комплемента в среду со слюной существенно изменило время генерации клеток. Для *L.rhamnosus LGG* и *L.casei DN-114001 defensis* время генерации клеток второго поколения увеличилось практически на час (64 и 56 мин. соответственно – $p < 0,001$ и отличия не выявлены), для *L.acidophilus* на 34 мин. ($p < 0,001$), *L.rhamnosus* и *L.casei* на 19 мин. ($p < 0,001$), а *L.acidophilus NK1* так же, как и в случае с добавлением только слюны, время деления клеток сократилось в среднем на 6 мин. ($p < 0,01$).

На основании проведенных экспериментов можно сделать заключение, что чувствительность к гуморальным факторам защиты каждого штамма лактобацилл является индивидуальным характерным свойством. Однако значимыми условиями могут оказаться не только индивидуальные свойства штамма, но и условия их культивирования.

Вместе с тем при сходных внешних условиях воздействия единственным отличием культивирования будет использование слюны, которое можно определить и назвать как «иммунологический фильтр».

Таблица 7 — Время генерации клеток лактобацилл при микрокультивировании с добавлением антимикробных факторов слюны

Штамм	I поколение				II поколение			
	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_I	p	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_{II}	p
<i>Lactobacillus acidophilus*</i> (контроль)	269±9	46,1	28	-	115±3	20	50	-
*+ слюна	193±9	47	30	<0,05	123±3	13	60	>0,05
*+слюна + К	224±6	35	30	<0,05	149±1	9	60	<0,05
<i>L.rhamnosus LGG*</i>	155±10	52,1	29	-	127±3	15	58	-
*+слюна	198±8	43	29	<0,05	131±2	16	58	>0,05
*+слюна + К	259±10	59	30	<0,05	191±2	14	58	<0,05
<i>L.casei DN-114001 defensis*</i>	89±6	35	30	-	132±2	14	60	-
*+слюна	181±5	28	30	<0,05	144±9	17	56	>0,05
*+слюна + К	236±7	37	30	<0,05	188±2	16	60	<0,05
<i>L.acidophilus NK1*</i>	201±8	44	30	-	159±2	12	56	-
*+слюна	153±4	15	29	<0,05	118±1	6	50	<0,05
*+слюна + К	167±3	14	30	<0,05	153±1	10	60	<0,05
<i>L.rhamnosus u L.casei*</i>	176±9	52	30	-	143±2	14	60	-
*+слюна	264±8	46	30	<0,05	154±1	10	54	<0,05
*+слюна + К	174±3	14	30	>0,05	164±1	10	60	<0,05

Примечание: *+Слюна – добавление антимикробных факторов слюны к изучаемым штаммам лактобацилл

*+Слюна + К - – добавление антимикробных факторов слюны с добавлением комплемента к изучаемым штаммам лактобацилл

Данный «фильтр», несомненно, будет оказывать практически одинаковое воздействие у близких родственников, что возможно определить микробиологическим путем, сравнивая особенности развития отдельных пробиотических штаммов лактобацилл, другими словами, одинаковая биологическая реакция данных штаммов даст основание говорить о действительном существовании «иммунологического фильтра».

Таким образом, логично предполагать, что возможна чувствительность отдельных штаммов лактобацилл к гуморальным компонентам иммунной защиты, представленным в слюне каждого конкретного человека (лизоцим, комплемент, IgA), и тогда в дальнейшем лечении необходимо использовать только те штаммы, которые нечувствительны с позиций ингибирования к

иммунной защите данного индивидуума. Данный факт был установлен для отдельных клеток лактобацилл, но неизвестно, будет ли соблюдаться это для целой популяции клеток с большой численностью. Изменение адаптивного поведения популяции лактобацилл можно быстро установить с использованием нефелометрического метода исследования.

Для проверки возможности популяционной перестройки микробной популяции под воздействием гуморальных факторов защиты, содержащихся в слюне, нами был использован нефелометрический метод исследования. Нефелометрический метод исследования развивающейся микробной культуры, несмотря на несовпадающие порой данные между численностью клеток популяции и их физиологическим состоянием, вместе с тем может дать информацию о направленности адаптивного процесса. Следует особо отметить, что данный метод не обладает большой инерционностью и вполне пригоден для получения информации о развивающейся микробной популяции в режиме online, а также позволяет говорить о направленности адаптивного процесса в целом.

4.2. Адаптивное поведение популяций различных видов микроорганизмов под воздействием антимикробных факторов слюны

Общеизвестно, что при попадании клеток бактерий в новую среду обитания происходит активная физиологическая перестройка популяции и последующая элиминация нежизнеспособных в дальнейшем клеток. Содержимое погибших клеток существенно изменяет вязкость среды, меняет структуру жидкости и привносит в новую среду обитания ферменты, обеспечивая тем самым возможность дальнейшего активного роста популяции жизнеспособных оставшихся клеток [62].

Совершенно очевидно, что в конкретных условиях среды обитания и в зависимости от определенного штамма бактерий, а также его физиологического состояния степень и скорость устранения этих клеток из состава популяции будет различна. Одними из первых факторов воздействия

на клетки лактобацилл при попадании в организм человека будет воздействие факторов гуморальной защиты и, в первую очередь, совокупного пула тех, которые содержатся в слюне. Можно предположить, что такого рода воздействие на различные виды микроорганизмов будет схожим. Однако, прежде чем провести исследования по этому вопросу для лактобацилл, мы предприняли ряд экспериментов: для грамотрицательных и грамположительных пробиотических культур (*E.coli M-17* и *B.subtilis*), которые обычно используются в микробиологической практике.

Установление закономерной элиминации клеток популяций бактерий из состава нормобиоты под воздействием гуморальных факторов защиты, содержащихся в слюне, представляется нам весьма интересным фактом. В слюне содержится большой спектр факторов гуморальной защиты – лизоцим, IgA и др. «Голодная» слюна была взята натощак у испытуемого за 2 часа до начала проведения эксперимента, затем ее центрифугировали, фильтровали и снятый супернатант прогревали при температуре 56⁰С в течение 30 минут. Тем самым достигали уменьшения роли различных сопутствующих факторов, а в прогретой слюне главными факторами гуморальной защиты можно считать лизоцим и IgA. Однако инактивация комплемента в испытуемой слюне переводит IgA в разряд неэффекторных компонентов, поскольку в данном случае связывание с клетками бактерий IgA возможно, но последующей гибели клеток не будет происходить.

Как мы уже отмечали выше, в качестве представителей нормобиоты были взяты штаммы бактерий *E.coli M-17* и *B.subtilis* из препаратов пробиотиков: «Колибактерин» и «Бактисубтил». Нефелометрический метод оценки состояния бактериальной культуры является количественным методом, способным охарактеризовать в целом реакцию популяции на действующий фактор.

В первой серии экспериментов были использованы указанные выше бактериальные культуры (1 мл суточной бульонной культуры + 9 мл жидкой среды МПБ) и использована слюна человека (1 мл) без добавления

комплемента. Установлено (Таблица 8), что ко второму часу эксперимента происходила активная перестройка физиологического состояния популяции. Популяция клеток становилась оптически более прозрачной, но говорить о гибели клеток на основании только нефелометрического метода исследований, к сожалению, нельзя.

Таблица 8 — Коэффициент пропускания развивающихся бактериальных культур *E.coli* M-17 и *B.subtilis* при добавлении антимикробных факторов защиты (слюна)

Время	Коэффициент пропускания бактериальных клеток культура+слюна			
	<i>E.coli</i>	Процент изменения во времени	<i>B.subtilis</i>	Процент изменения во времени
Начало измерений	54	0	30	0
Через 1 час	58	11,4±2	34	10,4±3
Через 2 часа	60	17,0±5	37	17,4±6
Через 3 часа	57	8,8±3	41	25,9±4
Контроль по H ₂ O	100	0	100	0

Примечание: % изменения во времени = % адаптивной перестройки популяции бактериальных клеток.

Практически одинаковый процент изменения коэффициента пропускания позволяет сделать вывод об одинаковых физиологических структурных перестройках для грамотрицательных и грамположительных культур на временном промежутке в 2 часа. Перестройка популяции грамположительных клеток продолжается и далее после второго часа исследований. Именно данный факт и определил причины использования культуры *B.subtilis* для более углубленного исследования.

Во второй серии экспериментов нами были изучены особенности развития культуры *B.subtilis* при добавлении дополнительных факторов, способных вызвать дальнейшую адаптивную физиологическую перестройку. Это нативная сыворотка кролика (термически не обработанная) и комплемента (К), который используется для постановки реакции связывания комплемента. Сыворотка крови кролика была взята специально в

эксперименте для устранения возможности побочных реакций между антителами сыворотки человека, IgA слюны и системой комплемента. В таблице 9 представлены результаты оценки физиологического состояния культуры *B.subtilis*.

Как и ранее, по полученным данным можно отметить углубление адаптивной перестройки популяции клеток *B.subtilis* в экспериментах с добавлением прогретой слюны к 3 часу наблюдений. Однако в этой серии экспериментов коэффициент пропускания значительно меньше (Таблица 9 – 13.9% по сравнению с данными Таблицы 8 – 25.9%). Но в целом тенденция в физиологической перестройке все-таки сохраняется прежней, что выражается в процентах изменения коэффициента пропускания развивающейся культуры.

Уменьшение процента изменений при использовании нативной сыворотки крови (термически не обработанной) возможно объяснить тем, что в составе сыворотки присутствовали дополнительные источники питания, что и вызвало активный рост клеток культуры ко 2 часу эксперимента.

Привнесение в среду культивирования только нативной сыворотки или нативной сыворотки вместе с К практически не сказывается на состоянии изучаемой популяции бактериальных клеток в первый час выполнения эксперимента. Наибольшее влияние на бактериальную популяцию вновь регистрируется ко второму часу культивирования.

Наибольший эффект оказывает добавление комплемента в чистом виде (3 час эксперимента, слюна + К) 20%, что позволяет предположить, что физиологическая структурная перестройка идет не по изменению оптической плотности клеток, а по воздействию системы комплемента на ту часть клеток популяции, к поверхности которых ранее прикрепились IgA.

Временная точка 3 часа в случае использования термически не обработанной сыворотки и комплемента может трактоваться как уже окончание физиологической перестройки бактериальной популяции клеток и

активное использование компонентов погибших клеток клетками, прошедшими физиологическую адаптивную перестройку.

Таблица 9 — Коэффициент пропускающей развивающейся культуры *B.subtilis* добавлением антимикробных факторов защиты (слюна, сыворотка, комплемент)

Время	Коэффициент пропускающей культуры <i>B.subtilis</i> с добавлением компонентов:					
	+слюна	Процент изменения	+слюна+ сыворотка	Процент изменения	+слюна+ К	Процент изменения
Начало измерений	37	0	55	0	47	0
Через 1 час	39	5,4±4	58	5,5±3	50	6,4±5
Через 2 часа	43	10,3±2	63	8,6±5	60	20,0±1
Через 3 часа	49	13,9±3	61	3,2±4	57	5,0±3
Контроль по H ₂ O	100	0	100	0	100	0

Сравнивая данные по коэффициенту пропускающей и процентам изменения физиологической перестройки популяции, можно предположить, что ко второму часу происходит ее завершение, и к третьему часу сохраняются все те же показатели по коэффициенту пропускающей (метрологическая ошибка измерений прибора – 2%). Отсутствие любого рода динамики (+/-) в процентах изменения в этом случае может служить признаком завершения этой перестройки, потому что при стремлении к 0 данный показатель характеризует состояние физиологического покоя, возникающего для изучаемой популяции клеток.

Таким образом, в результате работы нами установлено, что нефелометрический метод исследования может быть использован для быстрой скрининговой оценки физиологической устойчивости в ходе структурной перестройки бактериальной популяции различных культур микроорганизмов.

Наибольший эффект воздействия определенных факторов можно оптимально регистрировать на второй час выполнения эксперимента, по оценке физиологической перестройки бактериальной популяции. Можно также применять нативную сыворотку кролика при постановке экспериментов по оценке степени устранения комплексов бактериальная клетка + IgA нежелательно из-за присутствия компонентов, стимулирующих рост бактериальной культуры. При постановке регистрации присутствия и элиминации иммунных комплексов бактериальная клетка + IgA можно оптимально использовать только комплемент в чистом виде.

Полученные данные по физиологической реакции популяции нормобиоты при воздействии гуморальных факторов защиты, содержащихся в слюне человека, позволяют сделать предположение, как мы уже отмечали ранее, о возможной активной адаптивной перестройке популяции клеток лактобацилл.

Для оценки статистической значимости и информационной ценности измеряемого процентного изменения развивающейся культуры лактобацилл нами была предпринята серия из трех независимых экспериментов, выполненных в стандартных условиях постановки.

Представленные в таблицах 8 и 9 данные однозначно подтверждают факт дальнейшей возможности использования процента изменения коэффициента пропускания изучаемой культуры лактобацилл в оценке отдельных временных периодов. Сравнение результатов позволяют говорить о правильности предыдущего заключения о достоверности и возможности использования данных только одного эксперимента по оценке развития лактобацилл, поскольку фактическое повторение однотипной реакции клеток популяции лактобацилл на действующий дестабилизирующий фактор (слюна человека и слюна + К человека) было сходным.

Эти результаты дают основание говорить о достоверности статистических данных во всех экспериментах и для всех сравниваемых временных срезов развития популяций лактобацилл. Поэтому в дальнейших

исследованиях использовали результаты одного независимого эксперимента, выполненного в стандартных условиях проведения, при сохранении сходных значений для конкретной временной точки развития микробной популяции.

В таблицах 10 и 11 приведены данные 3 аналогичных экспериментов динамики развития популяций лактобацилл по оценке коэффициента пропуска для развивающихся культур в случае добавления в среду культивирования факторов гуморальной защиты человека (отличия результатов достоверны).

Таблица 10 — Процент изменения коэффициента пропуска развивающихся культур лактобацилл с добавлением антимикробных факторов слюны человека

Культура	Данные коэффициента Стьюдента по 3 экспериментам								
	1-2 эксперимент			1-3 эксперимент			2-3 эксперимент		
	1 час	2 час	3 час	1 час	2 час	3 час	1 час	2 час	3 час
<i>L. acidophilus</i>	3,86	5,79	9,13	9,32	2,75	5,76	5,46	3,27	5,64
Достоверность (P)	*	**	***	***	**	**	**	**	***
<i>L. rhamnosus LGG</i>	8,02	5,12	9,5	3,21	8,96	4,62	3,89	8,83	8,79
P	***	**	***	*	***	**	***	***	***
<i>L. casei DN-114001 defensis</i>	4,63	9,93	6,38	2,82	7,38	7,77	5,53	5,68	5,11
P	**	***	***	***	***	***	**	**	**
<i>L. acidophilus NK1</i>	9,1	6,5	4,07	4,29	8,77	5,8	5,64	3,82	9,9
P	***	***	*	*	***	**	**	**	**
<i>L. rhamnosus u L.casei</i>	5,44	5,4	3,43	8,1	4,77	5,69	3,2	5,12	4,67
P	**	**	*	***	**	**	*	**	**

Примечание: достоверность (P) отличия результатов

* - P < 0,05

** - P < 0,01

*** - P < 0,001

Таблица 11 — Процент изменения коэффициента пропускания развивающихся культур лактобацилл с добавлением антимикробных факторов слюны и комплемента человека

Культура	Данные коэффициента Стьюдента по 3 экспериментам								
	1-2 эксперимент			1-3 эксперимент			2-3 эксперимент		
	1 час	2 час	3 час	1 час	2 час	3 час	1 час	2 час	3 час
<i>L. acidophilus</i>	5,47	5,15	9,71	5,14	4,24	8,16	9,01	9,4	4,8
P	**	**	***	**	*	***	***	***	***
<i>L. rhamnosus LGG</i>	9,2	9,82	7,83	6,18	4,32	9,82	6,29	4,51	6,6
P	***	***	***	***	*	***	***	*	***
<i>L. casei DN-114001 defensis</i>	9,99	5,97	7,89	5,04	9,42	5,39	4,84	4,47	5,64
P	***	***	***	**	***	**	**	*	**
<i>L. acidophilus NK1</i>	4,89	4,5	8,95	9,94	7,03	5,99	9,84	5,51	4,99
P	**	*	***	***	***	***	***	***	***
<i>L. rhamnosus</i> и <i>L. casei</i>	5,21	8,99	3,91	4,91	3,98	7,97	9,86	5,43	4,45
P	**	***	*	**	*	***	**	***	*

Примечание: достоверность (P) отличия результатов

* - P < 0,05

** - P < 0,01

*** - P < 0,001

В ходе проделанной работы обнаружено (Таблица 12), что даже в популяции представителей нормобиоты фармакопейных препаратов после обработки слюной человека, в которой присутствуют IgA, а также слюной и системой комплемента одновременно происходит активная элиминация части клеток бактериальной популяции.

Сравнивая данные, можно констатировать тот факт, что метод нефелометрического анализа и метод микрокультивирования являются достаточно информативными и дают в большинстве случаев схожие

результаты, по оценке направленности адаптационного процесса развивающихся бактериальных популяций.

Таблица 12 — Коэффициент пропускания клеток лактобацилл нефелометрическим методом с добавлением антимикробных факторов слюны

Штамм	Время	*+Слюна		*+Слюна + К	
		коэффициент пропускания	процент изменения	коэффициент пропускания	процент изменения
<i>L. acidophilus*</i> (контр-роль)	0 ч.	72	0	72	0
	1 ч.	75	4,2±4	68	5,9±3
	2 ч.	69	8,7±7	64	6,3±5
	3 ч.	60	13±4	63	1,6±2
<i>L. rhamnosus LGG*</i>	0 ч.	59	0	56	0
	1 ч.	55	7,3±3	53	5,7±7
	2 ч.	43	27,9±2	44	20,5±4
	3 ч.	33	30,3±3	39	12,8±5
<i>L. casei DN-114001 defensis*</i>	0 ч.	67	0	67	0
	1 ч.	70	4,2±5	72	7,1±4
	2 ч.	77	9,1±3	75	4±7
	3 ч.	79	2,5±8	81	7,4±3
<i>L. acidophilus NK1*</i>	0 ч.	69	0	68	0
	1 ч.	73	5,5±6	65	4,6±1
	2 ч.	70	4,3±4	62	4,8±3
	3 ч.	67	4,5±3	60	3,3±5
<i>L. rhamnosus u L. casei*</i>	0 ч.	70	0	68	0
	1 ч.	69	1,4±3	63	8,3±6
	2 ч.	67	2,9±7	59	6,8±5
	3 ч.	62	8,1±2	55	7,3±2

Примечание: *+Слюна – добавление антимикробных факторов слюны к изучаемым штаммам лактобацилл

*+Слюна + К – добавление антимикробных факторов слюны с добавлением комплемента к изучаемым штаммам лактобацилл

Однако метод микрокультивирования, несмотря на высокую информативность и точность регистрации (до 10 минут), в целом довольно инертен и требует длительного временного периода (5 – 6 часов) для регистрации результатов и их последующей статистической обработки.

На основании полученных результатов нефелометрии можно сделать вывод о возможности индивидуального быстрого подбора пробиотических

штаммов лактобацилл при использовании слюны конкретного индивидуума. Другими словами, при активном росте лактобацилл в данных условиях можно говорить о том, что данные штаммы наиболее «подходят» для этого человека. Это позволит подобрать лактобациллы, наиболее подходящие для каждого конкретного человека, и включить их в повседневный рацион питания в ходе лечения или профилактики желудочно-кишечного тракта. Остается открытым вопрос о степени соответствия лактобацилл, оптимальных для конкретного индивидуума и других людей, т.е. будут ли в данном случае соблюдаться аналогичные адаптивные реакции этих штаммов микроорганизмов при взаимодействии с неспецифическими факторами защиты.

4.3. Оценка влияния антимикробных факторов защиты слюны между чужими и родственными людьми на лактобациллы

В перечне факторов неспецифической защиты в составе слюны человека присутствуют лизоцим и секреторный IgA, а также множество других ферментов, которые могут оказывать как прямое действие, на микроорганизмы, повреждая их, так и косвенное, ферментируя остатки пищи и, следовательно, уничтожая источники питания микроорганизмов [1]. Можно предположить, что такое воздействие на различные виды микроорганизмов будет схожим, поэтому оценка комплекса такого рода факторов способна дать новую информацию о начальных этапах гуморальной защиты человеческого организма. Необходимость понятия конкретных механизмов воздействия гуморальных факторов врожденного иммунитета, содержащихся в слюне человека, является крайне важной и необходимой задачей для дальнейшего создания селективных процессов в ходе получения чистых культур лактобацилл при их выделении из смеси различных видов микробных культур.

Для оценки физиологического состояния лактобацилл использовали штаммы лактобацилл, входящих в состав йогуртов: «Иммунеле» -

L.rhamnosus и *L.casei*, «Актимель» - *L.casei* DN-114001 *defensis*, «Белая киска» - *L.casei*, а также *L.fermentum* из препарата «Лактобактерин» производства НПО «Микроген» – с добавлением слюны родных сестер и/или братьев и постороннего (чужого – неродственного) человека. В эксперименте участвовали 5 пар близких родственников. Все участники – здоровые люди в возрасте от 15 до 20 лет, не имеющие острых и хронических заболеваний. Данными постороннего человека являлись результаты эксперимента, где выполняли сравнение для неродственных пар (не являющихся родственниками друг другу: братьями или сестрами). «Голодная» слюна была взята натощак у испытуемого за 2 часа до начала проведения эксперимента, затем ее центрифугировали и снятый супернатант фильтровали через фильтр МФМ-МА с диаметром пор 0,22 мкм, затем прогревали при температуре 56°C в течение 30 минут и тем самым достигали стерильности слюны и уменьшения роли сопутствующих факторов. В прогретой слюне главными факторами гуморальной защиты можно считать лизоцим и секреторный IgA.

В серии экспериментов брали 1 мл жидкой среды для культивирования лактобацилл и вносили 1 мл суточной бульонной культуры, далее добавляли слюну человека 1 мл и проводили совместную инкубацию тестируемого штамма лактобацилл и прогретой слюны.

Замеры состояния бактериальной культуры для определения коэффициента пропускания выполняли в течение последующих трех часов с интервалами 1 час.

В ходе работы было установлено, что у коэффициентов корреляции развивающихся популяций клеток лактобацилл при добавлении слюны родственников (Рисунок 10) превалировала сильная и очень сильная связь между признаками приближенная к единице, однако встречается и отрицательная (3 значения из 20, очень слабая связь) корреляция. При использовании слюны другого человека (не родственника) на эти же штаммы

лактобациллы (Рисунок 11) чаще всего встречалась умеренная и значительная связь между признаками и отрицательная (6 значений из 20).

Согласно основным свойствам корреляции обычно считается, что $r < 0,3$ указывает на слабую связь, при $0,3 \leq r \leq 0,5$ связь признается умеренной. Если же $0,5 \leq r \leq 0,7$, корреляция считается значительной, а при $0,7 \leq r \leq 0,9$ – сильной и при $r > 0,9$ – очень сильной, близкой к функциональной связи [38].

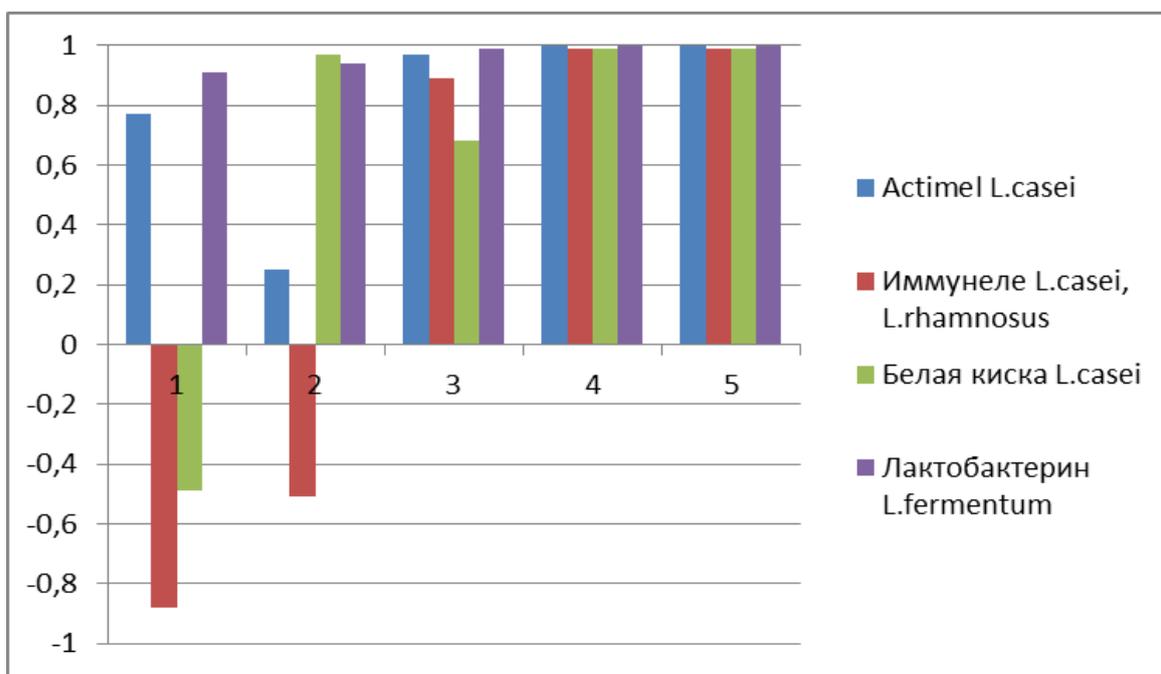


Рисунок 10 — Коэффициент корреляции развивающихся культур лактобацилл при добавлении в среду культивирования слюны 5 пар близких родственников

Высокий коэффициент корреляции позволяет сделать вывод об одинаковых физиологических структурных перестройках использованных штаммов лактобацилл под действием антимикробных факторов защиты у близких родственников на временном промежутке в 3 часа. Низкий коэффициент корреляции для чужих людей свидетельствует о непредсказуемой адаптивной реакции клеток популяций лактобацилл, что выражается в разнонаправленном процессе развития и гибели клеток.

Для данного эксперимента нами была использована слюна, подвергнутая термической обработке, которая привела к полному

разрушению комплемента и эффекторными компонентами слюны остались лизоцим и секреторный IgA. В данном случае нельзя предполагать абсолютно одинакового воздействия этих факторов на микробные культуры даже у близких родственников, поскольку в процессе онтогенеза индивидуумов произошла временная рассинхронизация процессов метаболизма в выработке лизоцима и IgA.

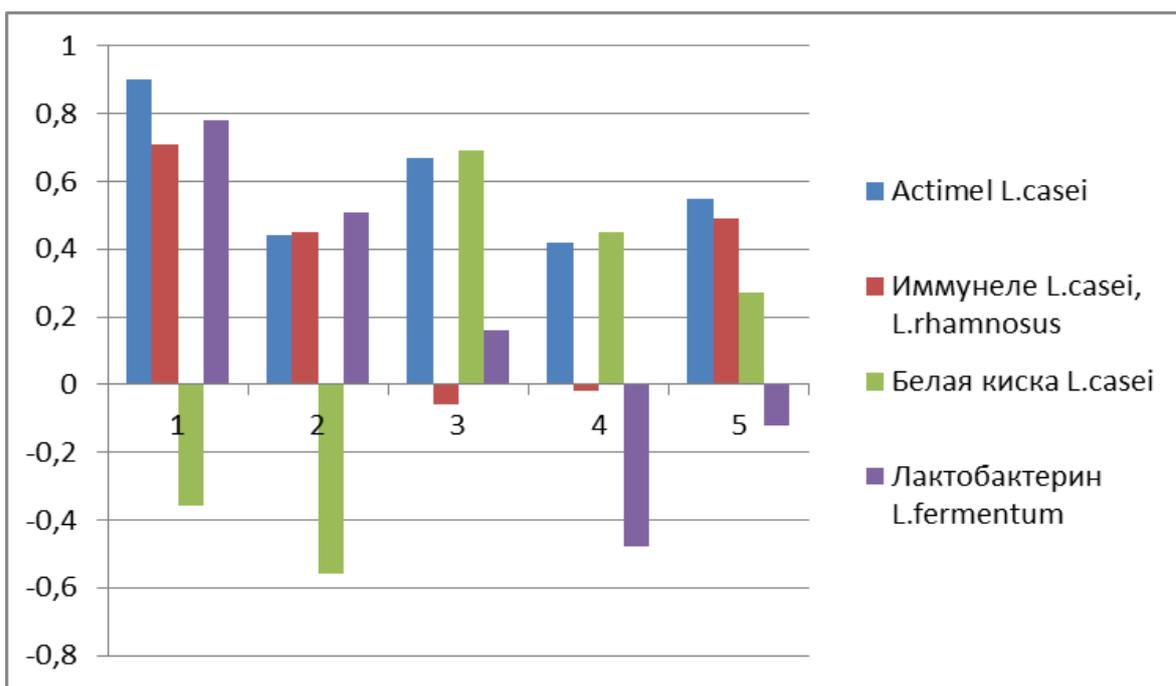


Рисунок 11 — Коэффициент корреляции развивающихся культур лактобацилл при добавлении слюны 5 пар чужих людей

Таким образом, сравнивая данные экспериментов, можно констатировать, что существует разная чувствительность отдельных штаммов лактобацилл к гуморальным компонентам иммунной защиты. Лизоцим, комплемент, секреторный IgA представлены в слюне каждого конкретного человека, причем в большинстве случаев чувствительность совпадает у близких родственников.

Однако адаптивная реакция лактобацилл на воздействие слюны в исследуемой паре может быть, как положительной, так и отрицательной. При этом могут регистрироваться практически одинаковые значения

коэффициента корреляции. Положительная адаптивная реакция популяций в данном случае – это активное размножение клеток популяций лактобацилл для каждого индивидуума в исследуемой паре.

Отрицательная адаптивная реакция популяций – это гибель клеток популяций лактобацилл для каждого индивидуума в исследуемой паре. Для нас имеет большее значение положительная адаптивная реакция развивающихся популяций отдельных штаммов лактобацилл в изучаемых парах людей, взятых в исследование.

В таблице 13 представлены результаты относительно предпринятой попытки сравнения корреляции при положительной адаптивной реакции в развитии популяций отдельных штаммов лактобацилл с учетом добавления в среду культивирования слюны близких родственников и чужих людей. По данным этой таблицы можно констатировать то, что у генетически близких родственников превалирует сильная и очень сильная связь между развитием практически для всех штаммов лактобацилл, приближенная к единице, а у чужих людей регистрируется умеренная и значительная корреляционная связь для тех же штаммов (первичные результаты коэффициента корреляции см. Приложение 2).

Таблица 13 — Средний положительный коэффициент корреляции развития популяций отдельных штаммов лактобацилл при добавлении слюны генетически близких и чужих людей

Штаммы	Бликие родственники	Чужие люди
Actimel <i>L.casei</i>	0,80±0,16	0,60±0,10
Иммунеле <i>L.casei</i> , <i>L.rhamnosus</i>	0,96±0,04	0,56±0,12
Белая киска <i>L.casei</i>	0,91±0,09	0,47±0,15
Лактобактерин <i>L.fermentum</i>	0,97±0,02	0,48±0,22

Для большей наглядности все эти данные по таблице 13 представлены на рисунке 12, где мы четко видим однотипную реакцию лактобацилл на

присутствие в среде культивирования неспецифических факторов защиты слюны. Причем гуморальные факторы защиты слюны близких родственников оказывают однозначно большее и схожее воздействие.

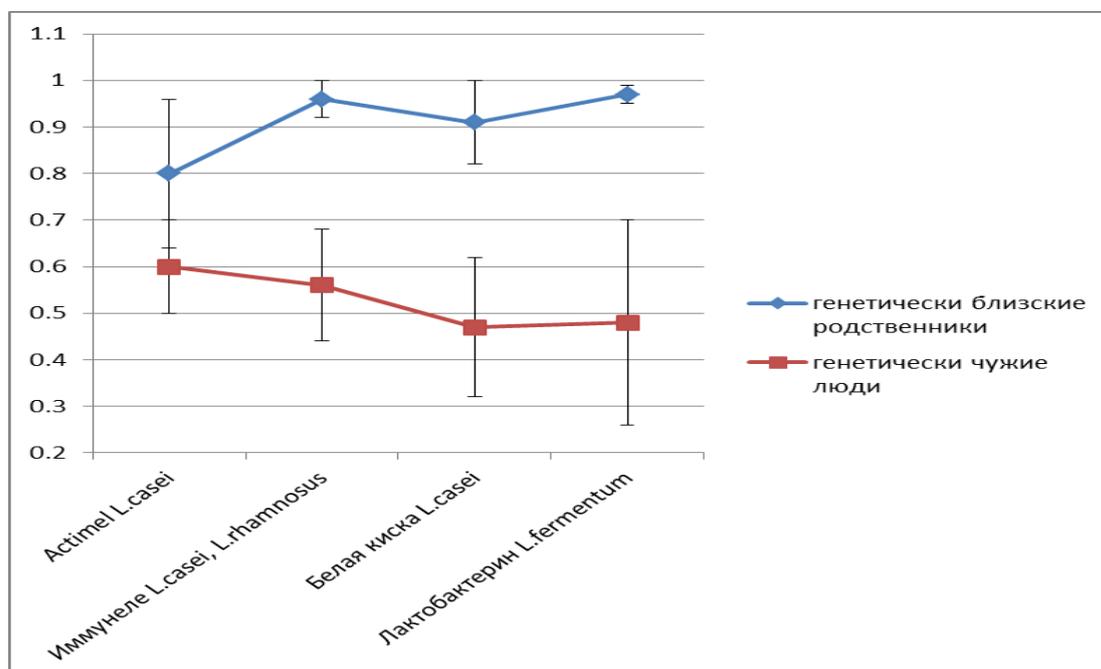


Рисунок 12 — Средний положительный коэффициент корреляции развития популяций отдельных штаммов лактобацилл при добавлении слюны близких родственников и чужих людей

Обнаруженный факт совпадения иммунного ответа для близких родственников позволяют сделать заключение о том, что именно IgA слюны ответственны за подобное совпадение по перестройке физиологической активности исследованных лактобацилл. Если данный факт имеет место, тогда использование IgA слюны близких родственников позволяет выделить для дальнейшего использования только те штаммы лактобацилл, которые нечувствительны с позиций ингибирования к иммунной защите данного индивидуума и группы близких родственников.

Таким образом, на основании всех представленных выше данных можно предположить: чем меньшее воздействие оказывает комплекс неспецифической защиты, содержащийся в слюне, тем большее сродство имеет данный штамм по биосовместимости для конкретного индивидуума.

Комплекс неспецифической защиты близких родственников совпадает для них и эффекторным компонентом слюны в данном случае служит IgA, что является прямым подтверждением сделанного нами ранее предположения о реальном существовании «иммунологического фильтра».

В связи с выше изложенным логично предположить, что необходим индивидуальный подбор штаммов лактобацилл для достижения максимально положительного эффекта в лечении и профилактике заболеваний ЖКТ. Следовательно, для дальнейшего использования лактобацилл, входящих в различные препараты и продукты функционального питания для конкретного индивидуума, необходимо использование только тех штаммов, которые дают положительную адаптивную реакцию.

Установленная нами однотипная адаптивная реакция для лактобацилл у генетически близких родственников на воздействие антимикробных факторов защиты слюны позволяет использовать эти штаммы внутри семейной группы в лечении и профилактике заболеваний ЖКТ.

Резюме. Пробиотики и продукты функционального питания на основе живых лактобацилл несут в себе огромный потенциал для поддержания и восстановления здоровья отдельного человека и человеческой популяции в целом. Они являются одним из самых эффективных средств профилактики и лечения практически всех заболеваний, но в первую очередь заболеваний, связанных с расстройством желудочно-кишечного тракта.

Внедрение в повседневную жизнь человека пробиотиков способствует сохранению и коррекции микробной экологии пищеварительного тракта за счет стимуляции роста «полезных» анаэробных бактерий. Все вышеперечисленные положительные эффекты будут проявляться, только если используемые лактобациллы в качестве основы будут биосовместимы с микроорганизмами нормальной микробиоты человека. Окончательные результаты по эффективности применения конкретного штамма лактобацилл устанавливаются только после предварительных тщательно проведенных исследований.

На основании результатов проведенных экспериментов гл. 4 можно сделать заключение, что чувствительность к гуморальным факторам защиты каждого штамма лактобацилл является индивидуальным свойством. Такими свойствами могут оказаться не только индивидуальные особенности штамма, но и условия их культивирования. Однако при сходных внешних условиях воздействия единственным отличием культивирования было использование слюны, и в данном случае это можно назвать существованием «иммунологического фильтра».

Данный «иммунологический фильтр», основанный на наличии антимикробных факторов защиты при использовании слюны конкретного индивидуума, оказывает практически одинаковое воздействие на лактобациллы у близких родственников. Это было подтверждено нами микробиологическим путем при сравнении особенностей развития отдельных пробиотических штаммов лактобацилл.

Таким образом, по результатам исследований мы получили объективную возможность надежного выделения аутопробиотического комплекса лактобацилл, который можно использовать для коррекции нарушений со стороны микробиоты ЖКТ, а также при проведении профилактических мероприятий.

ГЛАВА 5. Исследование свойств аутопробиотического комплекса лактобацилл *in vitro*

5.1. Получение аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл

В настоящее время для восстановления, нарушенного микробиоценоза наиболее распространенным приемом является введение человеку или животному в больших количествах антагонистических штаммов лактобацилл в качестве пробиотиков. Эти препараты и продукты питания на основе живых микроорганизмов являются достаточно эффективными лечебно-профилактическими средствами [74].

К сожалению, с расширением спектра показаний для назначения пробиотиков стала накапливаться информация, что положительный эффект пробиотиков даже при длительном применении нередко носит временный характер, а порой и полностью отсутствует. Более того, хотя безопасность использования пробиотических препаратов, добавок и продуктов питания является достаточно хорошо установленным фактом, появились отдельные сообщения о возникновении у лиц, длительно принимающих живые пробиотические микроорганизмы, различного рода осложнений [110].

Клинико–экспериментальные работы по бактериокоррекции дисбактериозов показали, что лучший эффект достигается при индивидуальном подборе донорских штаммов либо при использовании аутобиоты [45]. Все это служит основанием разработки концепции создания пробиотиков и продуктов функционального питания на составе аутоштаммов и аутоассоциаций симбиотических микроорганизмов, так называемых аутопробиотиков.

Микробная экология каждого человека представляет собой чрезвычайно сложную по составу систему, зависящую от состояния макроорганизма и, в первую очередь, от его возраста. Поэтому практически невозможно разработать пробиотики для каждого индивидуума для

поддержания нормальной микробиоты путем простого механического объединения отдельных промышленных и/или фармакопейных штаммов микроорганизмов.

В настоящее время в арсенале восстановления нарушенного микробиоценоза человека и животных используются разнообразные приемы, прежде всего, это введение в больших количествах в составе пробиотиков (фармакопейных препаратов или продуктов функционального питания) антагонистических штаммов бактерий – представителей нормальной микробиоты (бифидобактерий, лактобацилл и др.).

Однако их эффективность в значительной степени ограничена тем, что используемые в их составе в качестве действующего начала штаммы микроорганизмов – представителей нормальной микробиоты являются привносимыми (пусть даже и в больших количествах) и чужеродными для организма реципиента. Как результат, вносимые штаммы микроорганизмов из состава пробиотиков не приживаются на слизистых кишечника за счет наличия иммунологической резистентности и транзитом выводятся из организма.

В связи с этим для достижения положительных результатов от введения в макроорганизм пробиотических штаммов требуется их довольно длительное и регулярное применение в высоких концентрациях жизнеспособных клеток бактерий (не менее 10^7 КОЕ бактерий в 1 дозе). Нами был разработан способ получения аутопробиотического комплекса (АПК) (см. Приложение), содержащего живые лактобациллы [48]. Лактобациллы мы выделяли одновременно в виде естественных комплексов кишечника человека путем деконтаминации содержимого толстого кишечника от посторонней микробиоты за счет многократных разведений исследуемого материала жидкой питательной средой, пригодной для выделения и культивирования лактобацилл, с последующим удалением аллохтонной микробиоты. Для этого добавляли к биоматериалу,

разведенному до 10^{-6} , слюну того же индивидуума (своеобразный «иммунологический фильтр»), у которого был взят образец кишечного содержимого. Затем полученный материал культивировали в течение 48 часов при 38°C с дальнейшим пересевом полученной биомассы на жидкие питательные среды для культивирования лактобацилл без добавления селективных агентов.

Полученная биомасса является аутопробиотиком, содержащим комплекс лактобацилл, характерных для данного индивидуального организма, т.е. являющихся истинными представителями индигенной микробиоты хозяина. Контроль за микробным представительством штаммов полученного аутопробиотика осуществляли согласно общепринятым бактериологическим методам посева на различные селективные питательные среды: Эндо, Плоскирева, ЖСА и др. для определения посторонней микробиоты. На этих средах рост в аэробных условиях должен отсутствовать. Далее определяли количественное содержание лактобацилл в полученном аутопробиотике. Пробиотики на основе лактобацилл обычно содержат в своем составе не более двух видов бактерий, а полученный нами аутопробиотик содержит большое видовое разнообразие лактобацилл.

Несмотря на то, что мы получили препарат, содержащий только комплекс лактобацилл, возникает очень серьезный вопрос о необходимости выполнения экспресс-контроля качества, полученного АПК. Обычные методики бактериологического контроля с целью оценки «чистоты» полученного АПК (Рисунок 13) на заключительной стадии, а также при возникновении необходимости (подозрения на контаминацию посторонними видами микроорганизмами), являются слишком продолжительными по времени.

В данном случае необходимо быстро в течение буквально нескольких часов убедиться в полной «чистоте» готового выделенного АПК для последующего его возможного масштабирования или размещения на

длительное хранение при пониженной температуре рефрижератора (например, при минус 20 °С).

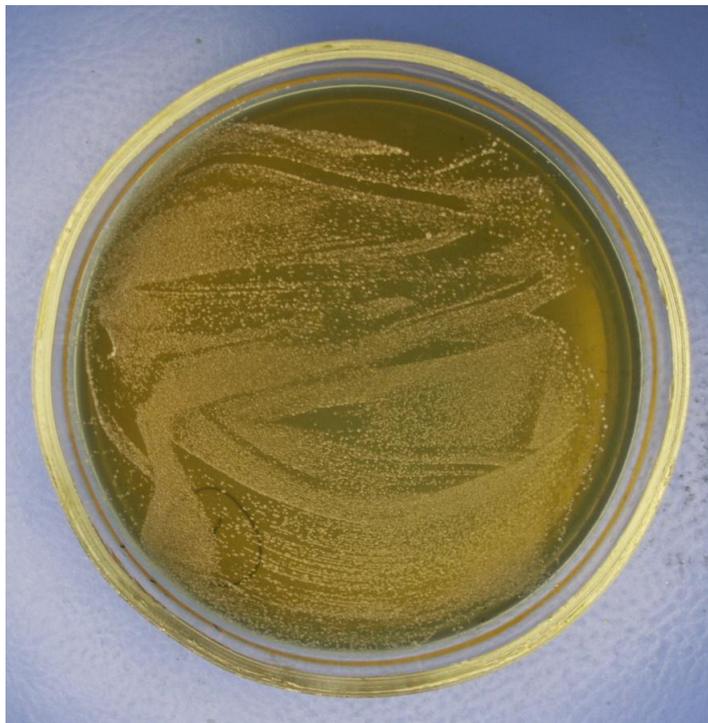


Рисунок 13 — Выделенный комплекс аутопробиотических штаммов лактобацилл на агаризованной среде MRS в различных разведениях (10^{-6} – верхний снимок, 10^{-9} – нижний снимок)

Из всех существующих в настоящее время методов, которые могли бы быстро разрешить все поставленные выше вопросы, возможно, только один метод удовлетворяет всем требованиям для такого рода оценки степени готовности АПК для практического использования.

Таким методом является метод MALDI TOF, который используется сейчас для идентификации микроорганизмов, но в принципе он никогда не использовался ранее для оценки вновь полученных комплексных препаратов АПК микробиоты кишечника человека.

5.2. Метод MALDI TOF как референсный метод для оценки чистоты аутопробиотических комплексов лактобацилл

В настоящее время уже не подвергается сомнению утверждение об эффективности использования аутопробиотических штаммов лактобацилл. Однако в настоящее время неизвестно, насколько сходными по видовому составу между собой являются аутопробиотические комплексы видов лактобацилл, выделенных у генетически близких родственников. Главным образом это определяется сложностью и трудоемкостью традиционных бактериологических методик выделения и идентификации отдельных штаммов лактобацилл из данного аутопробиотического комплекса (АПК).

Сейчас существует возможность полной расшифровки геномов бактерий из состава подобного комплекса на основе генетического анализа и, соответственно, определения таким образом его видового состава, но данный метод все еще остается экономически чрезвычайно затратным и малодоступным. Использование других современных методов видовой идентификации микроорганизмов, таких как ПЦР и ИФА, может помочь в решении данной проблемы. Однако время и точность анализа в методиках ПЦР и ИФА сейчас значительно уступают новому методу идентификации микроорганизмов – MALDI TOF масс-спектрометрии.

Особенностями и преимуществами MALDI TOF масс-спектрометрии перед традиционными методами микробиологических исследований являются: высокая чувствительность, относительная простота получаемых

масс-спектров, высокая скорость измерения, возможность автоматизации и роботизации всех стадий исследования [5, 24, 81], а также быстрое получение окончательных данных, в том числе для идентификации лактобацилл.

Метод MALDI TOF использовали для установления основных показателей в спектрах макромолекул штаммов лактобацилл, входящих в состав пробиотических препаратов, которые можно использовать в дальнейшем определении родовых признаков. В работе использованы штаммы *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) из коммерческого лиофилизированного пробиотического препарата «Лактобактерин» (производство «Биомед») и *Lactobacillus fermentum* (*L.fermentum 90T-C4*) препарата «Лактобактерин» (производство НПО «Микроген»), а также *L.acidophilus* штамм n.v. Ер 317/402 «Наринэ» (производство ООО «НАРЭК»).

Результаты получали на масс-спектрометре Shimadzu фирмы Biotech Axima в режиме положительных ионов с использованием в качестве матрицы СНСА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота). Метод позволяет регистрировать молекулярную массу фрагментов макромолекул комплекса аутопробиотических штаммов. Метод основан на времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией-ионизацией при содействии матрицы. В наших исследованиях взвесь бактериальных клеток, предварительно выращенных в питательной среде MRS (до концентрации 10^7 – 10^9 кл/мл), смешивают с насыщенным раствором вещества-матрицы, что приводит к их совместной кристаллизации. Лазерный импульс вызывает ионизацию и взрывное испарение матрицы вместе с исследуемыми белками. Образующиеся ионы разгоняются в безвоздушной среде электростатическим полем, после чего пролетают через участок без ускорения и врезаются в мишень детектора; при этом прибор регистрирует время пролета ионов, которое будет отражать молекулярную массу фрагментов макромолекул ($M_{ФМ}$). Анализ спектров осуществлялся с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0.

Для выполнения сравнительного анализа все полученные нами экспериментальные данные по лактобактериям с использованием метода MALDI TOF на матрице CHCA были сведены в таблицу 14.

На основе данных, представленных в таблице 14, определено наличие несколько пиков $M_{ФМ}$, которые обнаруживаются во всех экспериментах с чистой питательной средой MRS, а также при культивировании на данной среде лактобацилл (пики $M_{ФМ}$ 104, 234, 266, обозначение: в таблице 14 ячейки выделены серым цветом). Это позволило нам предположить, что данные пики соответствуют пикам $M_{ФМ}$ для чистой питательной среды.

При дальнейшем сравнительном анализе были установлены интересные факты относительно наличия или отсутствия отдельных пиков $M_{ФМ}$ в исследуемом материале как для отдельных штаммов лактобацилл из состава пробиотических препаратов, так и выделенных нами аутопробиотических комплексов в изучаемых группах людей разного возраста.

Так, установлено, что существуют отличия в спектре полученных данных $M_{ФМ}$ для лиофильно высушенных лактобацилл и аутопробиотического комплекса, выращенного на MRS. Пик $M_{ФМ}$ 113/114 присутствует в чистой питательной среде MRS и во всех образцах аутопробиотических комплексов. Одновременно зарегистрировано отсутствие данного пика $M_{ФМ}$ во всех образцах лиофильно высушенных лактобацилл без предварительного ресуспензирования их в жидкой питательной среде. В то же время нами отмечается факт наличия пика 120 в среде MRS и в одном из образцов лактобацилл (*L.acidophilus n.v. Ep 317/402*).

Обнаружено, что в некоторых образцах лиофильно высушенных штаммов лактобацилл и детского аутопробиотического комплекса этот пик не зарегистрирован. Это можно объяснить особенностями процесса культивирования отдельных видов лактобацилл, а также спецификой их биохимических обменных процессов, что сказывается на обнаружении данного пика $M_{ФМ}$ в экспериментальных образцах. Косвенно это

предположение подтверждается тем, что пик $M_{ФМ}$ 120 обнаруживается в аутопробиотическом комплексе у детей, в то время как у взрослых он отсутствует.

Таблица 14 — Спектр значимых величин макромолекул при оценке пробиотических штаммов лактобацилл и аутопробиотических комплексов

Очередность пролета макромолекул	MRS	Лиофильно высушенные культуры			АПКД	АПКВ
		<i>L.acidophilus</i>	<i>L.acidophilus</i> <i>n.v.</i> <i>Ep317/402</i>	<i>L.fermentum</i> <i>90T-</i>		
1	104	104	104	104	104	104
2	0	0	0	0	0	107
3	113	0	0	0	114	0
4	120	0	120	0	0	120
5	0	0	0	0	126	126
6	0	132	132	0	0	0
7	0	0	0	0	0	140
8	0	147	146	146	147	146
9	0	0	0	0	0	156
10	0	163	163	163	0	0
11	0	172	173	173	0	0
12	0	190	190	190	190	0
13	0	213	212	213	213	213
14	0	228	228	228	228	228
15	234	234	234	234	234	234
16	0	250	250	250	250	250
17	266	266	266	266	266	266
18	0	294	294	0	294	0
19	0	0	309	0	0	0
20	0	335	335	335	0	0
21	0	367	0	0	0	0
22	0	0	0	377	0	0
23	0	380	380	380	0	0
24	0	0	400	0	0	0
25	0	0	0	0	422	0
26	0	0	0	0	0	461
27	0	477	477	477	0	477
28	0	0	0	688	0	0

В ходе анализа установлено наличие всех пиков $M_{ФМ}$ в экспериментах, где присутствуют лактобациллы различных видов и аутопробиотических комплексов – 146/147, 212/213, 228, 250. Данный факт позволяет сделать предположение о характерных родовых признаках лактообактерий.

Нами был установлен факт присутствия пиков $M_{ФМ}$ только для лиофильно высушенных лактобацилл из состава пробиотических препаратов ($M_{ФМ}$ 163, 173, 335, 380) и их полное отсутствие в полученных нами аутопробиотических комплексах. В данном случае можно предположить, что вещества с указанными выше пиками $M_{ФМ}$ не могут быть извлечены при исследовании экспериментальных образцов с использованием в жидких питательных средах. Однако в ряде случаев встречаются пики $M_{ФМ}$ 132, 190 для лиофильно высушенных лактобацилл из препаратов пробиотиков ($M_{ФМ}$ 132), и детей $M_{ФМ}$ 190 (у взрослых его отсутствие), и пик $M_{ФМ}$ 294 у *L.acidophilus*, *L.acidophilus n.v. Ep 317/402*, и в то же время он отсутствует у *L.fermentum 90T-C4*. Причем пик $M_{ФМ}$ 132 характерно присутствует для лиофильно высушенных препаратов лактобацилл одного вида - *L.acidophilus* и зарегистрировано отсутствие данного пика для лактобацилл *L.fermentum 90T-C4*.

Данный пик $M_{ФМ}$ 132 также отсутствует в спектрах, выделенных аутопробиотических комплексов детей (АПКд) и взрослых (АПКв), что может быть следствием наличия в АПК детей и взрослых других видов лактобацилл, чем в пробиотических препаратах «Лактобактерин» различных производителей. Данный вывод косвенно подтверждает присутствие пика $M_{ФМ}$ 294 у *L.acidophilus*, *L.acidophilus n.v. Ep 317/402* и в выделенном (АПКд), а также его отсутствие у *L.fermentum 90T-C4* для пробиотических препаратов.

Наличие пика 422 в спектрах $M_{ФМ}$ у АПКд может свидетельствовать о возможной видовой характеристике лактобацилл, присущей детскому комплексу, а также пики 140, 156, 461 обнаружены у АПКв. Косвенным фактом в пользу данного предположения может служить пик 477, который

есть у лиофильно высушенных лактобацилл и АПКв, а у АПКд он отсутствует. Регистрация отдельных пиков $M_{ФМ}$, присущих только для АПК различных возрастных групп ($M_{ФМ}$ 294, 422 для АПКд и $M_{ФМ}$ 107, 140, 156, 461, 477 для АПКв) может расцениваться как регистрируемая специфичность выделенных АПК лактобацилл в процессе культивирования на жидкой MRS.

Появление в спектре отдельных «выскакивающих» значений для пиков $M_{ФМ}$ лактобацилл может быть следствием сложности процессов их биологического взаимодействия в смешанных культурах. В целом все это может быть на текущий момент расценено как погрешности выполнения экспериментов и особенности инструментального исполнения метода MALDI TOF для каждого конкретного АПК лактобацилл.

Таким образом, на основе полученных нами данных при использовании метода MALDI TOF можно судить о видовой неоднородности лактобацилл в полученных аутопробиотических комплексах для детей и взрослых. Это может свидетельствовать об индивидуальных возрастных и видовых особенностях, выделенных нами АПК детей и взрослых.

Установлена возможность применения метода MALDI TOF для сравнения различных видов лактобацилл как лиофильно высушенных препаратов, так и жидких аутопробиотических комплексов.

Метод MALDI TOF масс-спектрометрии показал возможность быстрого, дешевого и надежного определения степени чистоты комплекса и контроля получаемых индивидуальных аутопробиотических комплексов лактобацилл микробиоты толстого кишечника. Он может служить в качестве референсного экспресс-метода готовности выделяемых аутопробиотических комплексов (подтверждения присутствия в нем активных лактобацилл) и для заключительной оценки степени чистоты и качества относительно контаминационной безопасности.

Полученные нами данные открывают перспективу использования метода MALDI TOF масс-спектрометрии для дальнейшего сравнительного

анализа выделяемых аутопробиотических комплексов лактобацилл у генетически близких родственников разного возраста.

5.3. Определение степени биологического сродства аутопробиотического комплекса лактобацилл у близких родственников разного возраста

В настоящее время остается нерешенным вопрос о возможности своеобразной «идентичности» лактобацилл, которые находятся в аутопробиотическом комплексе микроорганизмов кишечника у генетически близких родственников. Поэтому необходимо сравнить комплексы лактобацилл аутопробиотических штаммов генетически близких родственников при использовании метода MALDI TOF.

В исследовании участвовали две группы генетически близких родственников (братья, сестры). В первую группу входили дети в возрасте от 1 года до 5 лет (n=14), выросшие на естественном грудном молоке до года, во вторую – взрослые от 25 до 30 лет (n=18). Для выполнения дальнейшего исследования по установлению сходства аутопробиотических комплексов лактобацилл каждая группа распределялась попарно в соответствии с генетически близким семейным родством (брат-брат, сестра-сестра).

В ходе выполнения работы были получены комплексы аутопробиотических штаммов лактобацилл кишечника генетически близких родственников. На основе выполнения традиционных бактериологических методик было подтверждено, что в каждом случае выделенный комплекс аутопробиотических микроорганизмов кишечника представлен только бактериями рода *Lactobacillus* и не контаминирован представителями других родов (подтверждали бактериологическим методом, учитывая Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004–2003, Приказ Министерства здравоохранения РФ № 231 от 09.06.2003, см. Приложение 3, Рисунки 1-3)).

После получения аутопробиотического комплекса (АПК) лактобацилл [48] в питательной среде MRS далее использовали метод MALDI TOF для сравнительной оценки $M_{ФМ}$ [5].

Результаты данных экспериментов представлены на рисунке 14, где отражены спектры молекулярных масс фрагментов макромолекул аутопробиотического комплекса, выделенного от детей.

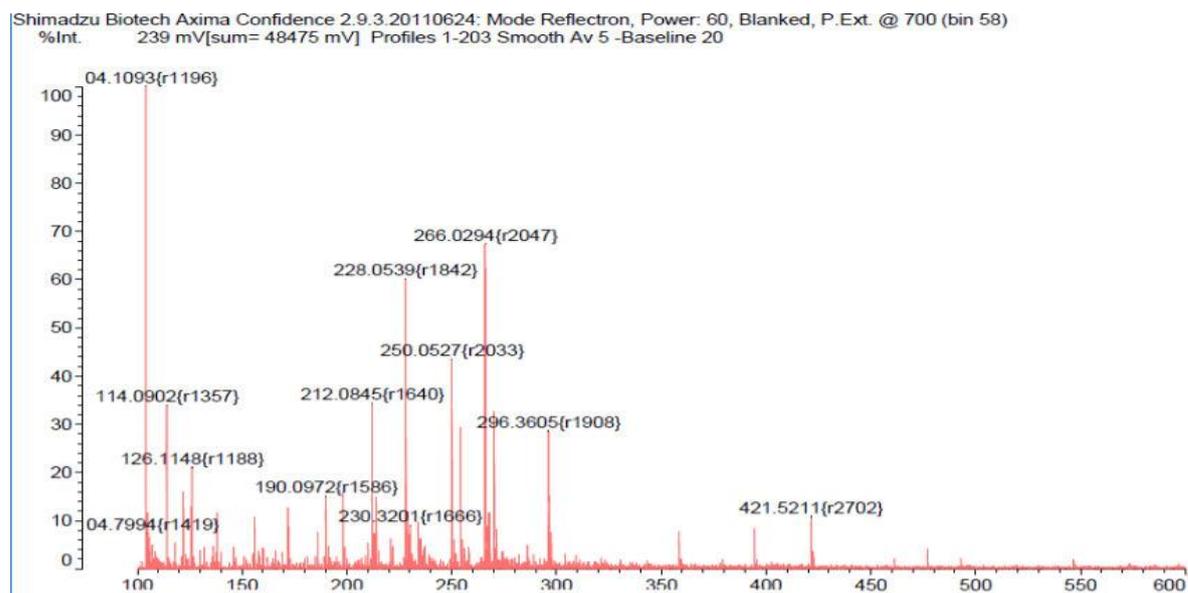


Рисунок 14 — Масс-спектр аутопробиотического комплекса, выделенного от одного ребенка

Для родственных пар детей и взрослых были проанализированы все пики для спектров $M_{ФМ}$ для выделенного комплекса лактобацилл с учетом пиков, характерных для чистой питательной среды. В соответствующих парах родственников были подсчитаны проценты совпадений установленных пиков в спектрах $M_{ФМ}$.

Установлено, что в исследованных парах детей генетически близких родственников в возрасте от 1 года до 5 лет наблюдается совпадение пиков в спектре $M_{ФМ}$ для выделенного комплекса лактобацилл на 49,9% (min – 47%, max – 53%, CV – 4,2%) а у взрослых в возрасте 25 – 30 лет регистрируется его снижение до 30,5% (min – 27%, max – 36%, CV – 12,3%). Значения t-критерия Стьюдента для вариационных рядов – 18,54 при $p < 0,05$.

Меньший процент совпадения спектра $M_{\text{ФМ}}$ у исследованных пар родственников в возрасте от 25 до 30 лет можно объяснить тем, что у них произошла частичная смена видового состава из-за изменения в рационе питания. Кроме того, это может быть следствием постепенного повышения с возрастом видового разнообразия микроорганизмов нормальной микробиоты из-за постоянных контактов с новыми видами лактобацилл, потенциально способных к колонизации толстой кишки, что в принципе согласуется с данными других исследователей [111].

В связи с этим при назначении препаратов, содержащих живые лактобациллы, следует учитывать их биосовместимость с нормобиотой кишечника каждого конкретного человека. Аутоштаммы лактобацилл, выделенные от конкретного индивидуума, точно не будут проявлять антагонистические свойства к другим бактериям нормобиоты кишечника, следовательно, закрепятся и не выведутся из организма после окончания приема препарата. Поэтому необходим индивидуальный подбор аутоштаммов лактобацилл для достижения максимально положительного эффекта в лечении и профилактике заболеваний ЖКТ, в том числе и инфекционной природы, даже среди генетически близких родственников разного возраста.

Проведенные нами исследования касались различных пар генетически близких родственников (не близнецов). Причем детские пары проживают вместе, а взрослые раздельно. При изучении АПК близких родственников мы проводили сравнение спектров $M_{\text{ФМ}}$ в их минимально возможном представительстве от одной пары, поскольку включение в эксперимент дополнительных участников (близких родственников) осложнило бы расшифровку полученных данных.

В идеальном случае абсолютного совпадения спектров $M_{\text{ФМ}}$ близких родственников мы имели бы 100% вариант соответствия, и здесь можно говорить о развитии и закреплении в онтогенезе для этих родственников специфического и генетически детерминированного комплекса лактобацилл.

Однако это будет справедливо только при использовании в эксперименте АПК, выделенных от однояйцевых близнецов, живущих в идентичных условиях, и в настоящее время мы пока не обладаем такими данными. Именно поэтому нами и были получены такие несколько расходящиеся данные относительно совпадения АПК по данным метода MALDI TOF в исследованных группах детей и взрослых.

Таким образом, полученные нами данные парного сравнения спектров $M_{ФМ}$, установленных методом MALDI TOF для исследованных групп генетически близких родственников детей и взрослых, позволяют быстро определить чистоту выделенного АПК (отсутствие посторонних бактериальных видов – контаминантов). Подтверждением данного факта являются стабильные совпадения спектров $M_{ФМ}$ АПК для исследованных групп различного возраста.

Сравнительная оценка спектров $M_{ФМ}$ MALDI TOF позволяет исследовать аутопробиотические комплексы без предварительного выделения (подготовки) отдельных штаммов и их видовой идентификации (соответствия) лактобацилл.

5.4. Масштабирование процесса приготовления молочнокислого аутопробиотического продукта

Производство молочнокислых продуктов, которые могут быть использованы для коррекции и восстановления нормальной микробиоты кишечника при дисбактериозе, несомненно, является важным биотехнологическим процессом. Особенно это важно в случае получения продуктов, содержащих живые аутопробиотические штаммы. Первоначально необходимо выделить данный аутопробиотический комплекс (АПК) штаммов.

После выделения данного комплекса следует этап получения готового продукта, и в данном случае возникает чрезвычайно важный вопрос сохранения качества и количества исходного инокулята, заселяемого в биотехнологическое сырье (цельное молоко без антибиотиков), АПК

штаммов лактобацилл. Комплекс живых лактобацилл с соблюдением правил асептики помещали в равном объеме (1 мл) и количестве микроорганизмов (не менее 10^7 КОЕ/мл) в стерильные ампулы и замораживали при -20°C для приостановки физиологических процессов. Полученные результаты длительного (двухгодичного!) эксперимента представлены в таблице 15.

Для проверки жизнеспособности лактобацилл, входящих в состав полученного нами АПК, после низкотемпературной консервации (-20°C) (патент США №3975545) нами был выполнен эксперимент в течение двух лет. Ампулы с АПК, находящиеся на хранении в морозильной камере, периодически доставали через 3-6-9-12-24 месяца.

Таблица 15 — Влияние времени криоконсервирования при минус 20°C на развитие АПК при оценке нефелометрическим методом

Время криоконсервации	Оптическая плотность D (n=10)		Кратность изменения средних величин D		
	Время культивирования				
	24 часа	48 часов	24/0 час.	48/0 час.	48/24 час.
0 мес. (контроль)	0,29±0,02	-	24/0 час.	48/0 час.	48/24 час.
3 мес.	0,30±0,01	1,36±0,02	1,04	4,69	4,50
6 мес.	0,29±0,01	1,39±0,02	0,99	4,48	4,83
9 мес.	0,28±0,01	1,30±0,01	0,96	4,51	4,68
12 мес.	0,28±0,01	1,23±0,01	0,95	4,24	4,44
24 мес.	0,26±0,03	1,11±0,01	0,88	3,85	4,36

После кратковременного оттаивания данных ампул (без окончательного размораживания) содержимое помещали в жидкую питательную среду (MRS), затем инкубировали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов для оценки жизнеспособности АПК. Оценку жизнеспособности подтверждали путем сравнения исходного состояния АПК до момента низкотемпературной консервации и сравнения оптической плотности АПК для определенного временного отрезка данного эксперимента после культивирования.

В ходе выполнения данного эксперимента обнаружено, что жизнеспособность лактобацилл, входящих в состав АПК, при замораживании и длительном сохранении незначительно снижается, судя по значениям оптической плотности. Однако при культивировании исследуемого материала (АПК), ранее подвергнутого криоконсервированию, через 48 часов, регистрируется существенный рост оптической плотности относительно первого дня культивирования (24 часа) более чем в 4 раза (Рисунок 15).

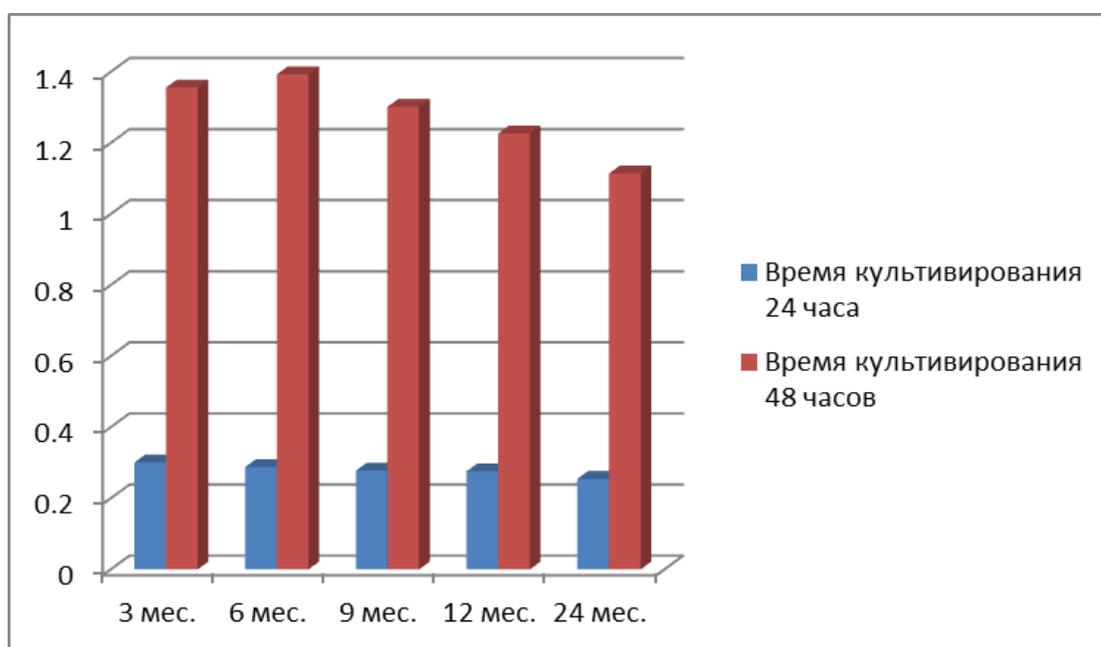


Рисунок 15 — Оптическая плотность АПК после 24 и 48 часов культивирования

Интересным представляется факт по оценке численности лактобацилл после восстановления АПК в молоке, т.е. в готовом продукте. Для получения готового молочнокислого продукта содержимое одной из ампул без предварительного размораживания помещали в ультрапастеризованное цельное молоко и затем инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов для накопления биомассы. После получения готового молочнокислого продукта определяли количество лактобацилл (КОЕ/мл) при начальном использовании криогенно сохраненного инокулята АПК. Как было

установлено в независимой Испытательной микробиологической лаборатории Росстандарта (г. Иваново), титр лактобацилл в готовом молочнокислом продукте при масштабировании роста лактобацилл из состава АПК достигал количества 10^7 - 10^8 кл/мл (Протокол исследований №б/н от 22 июня 2018 г. см. Приложение), что соответствует техническому регламенту таможенного контроля «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013). Кроме того, установлено, что практически не наблюдалось изменений по количеству лактобацилл в готовых продуктах различных серий при использовании одного и того же инокулята (титр - 10^7) – Протокол исследований №б/н от 31 августа 2018 г.

Таким образом, нами установлена возможность длительного сохранения и последующего использования предварительно замороженного аутопробиотического комплекса штаммов живых лактобацилл в условиях низкотемпературного воздействия (при минус 20 °С в течение 24 месяцев).

Способ получения готового молочнокислого продукта на основе индивидуального комплекса лактобацилл (АПК) обладает несомненной привлекательностью в плане использования существенно более высокой в сравнении с жидким азотом температуры. Достижение такой температуры может быть обеспечено простым морозильным оборудованием. Кроме того, сам процесс замораживания осуществляется достаточно быстро и, что немаловажно, в одну стадию. Последнее обстоятельство важно для возможного масштабирования процесса.

В связи с полученными нами данными можно констатировать тот факт, что однозначно существует возможность получения консервированной формы препарата в виде замороженного бактериального препарата АПК, содержащего живые лактобациллы, без потери их жизнеспособности и активности при длительном хранении (не менее 2 лет). Длительность хранения лактобацилл без потери их жизнеспособности и активности представляет собой весьма интересный вопрос и в дальнейшем может представлять значительный научный интерес с точки зрения перспектив

создания банка АПК лактобацилл с возможностью быстрого получения необходимого количества продуктов функционального питания для лечения и профилактики заболеваний ЖКТ у конкретных индивидуумов.

Таким образом, при использовании замороженного АПК можно выполнить быстрое масштабирование объемов необходимого индивидуального молочнокислого продукта, что имеет большое значение для лечения и профилактики дисбактериоза кишечника. Также установлено, что практически не наблюдалось изменений по количеству лактобацилл в готовых продуктах различных серий при использовании одного и того же инокулята в одинаковом объеме.

5.5. Влияние натуральных биологически активных веществ гриба

Шиитаке (*Lentinus edodes*) на развитие лактобацилл

аутопробиотического комплекса

Основываясь на ранее полученных нами данных по стимуляции роста и развития лактобацилл, в ходе микрокультивирования были предприняты эксперименты по оценке возможности стимуляции АПК с использованием в качестве стимулятора природных компонентов гриба Шиитаке. Напоминаем, что в процессе микрокультивирования лактобацилл использовали в качестве добавки в питательную среду сок гриба Шиитаке (*Lentinus edodes*), полученный из плодовых тел первого урожая. В последующих экспериментах кроме данной фармакопейной добавки (сок) мы решили использовать также дополнительные компоненты гриба Шиитаке (порошок) в разной концентрации.

В экспериментах использовали в качестве стимулятора роста лактобацилл фармакологические формы высшего съедобного гриба Шиитаке, а именно: стерильный натуральный сок (от объема) или порошок 2,5% (от веса) питательной среды.

Сок получали путем механического измельчения плодовых тел гриба. Из полученной биомассы выжимали сок, который подвергался стерилизации путем ультрафильтрации, например, с использованием

каолиновых свечей Шамберлана с размером пор 0,12 мкм. Порошок гриба Шиитакэ получали путем высушивания свежих грибов при температуре 70⁰С до влажности 10-12% и размалывали до размера частиц 0,2-1,0 мм, а затем стерилизовали вместе с питательной средой лактобакагар в автоклаве при температуре 121±1⁰С в течение 15 минут.

Была проведена сравнительная оценка колониеобразующей (КОЕ) способности лактобацилл из состава препарата Лактобактерин при посеве на питательную среду – лактобакагар и среду лактобакагар с добавлением стерильного сока или порошка высшего съедобного гриба Шиитакэ. Для этого биомассу лактобацилл из препарата Лактобактерин высевали на питательную среду из разведения препарата на физиологическом растворе 10³. В опыте в питательную среду вносили стерильный сок или порошок гриба; в качестве контроля использовались разведения среды без внесения стимулятора (сок или порошок гриба Шиитакэ). Результаты представлены в таблице 16.

При внесении сока в среду в меньшей концентрации (менее 2,5% от объема защитной среды) стимулирующий эффект на лактобациллы был выражен незначительно. При увеличении концентрации более 2,5% стимулирующий эффект не изменялся, судя по количеству КОЕ/мл лактобацилл, поэтому считаем нецелесообразным увеличивать дозу стимулятора, так как эффект не изменялся, но увеличивался его расход.

При внесении различных фармакологических форм гриба Шиитакэ достоверно ($p < 0,05$) увеличивалось число колониеобразующих единиц лактобацилл с 5,24±0,49 КОЕ*10³/мл в контроле до 7,32±0,47 КОЕ*10³/мл с соком, а с порошком – до 7,66±0,42 КОЕ*10³/мл. Процент увеличения КОЕ*10³/мл *L.acidophilus* с добавлением сока по сравнению с контролем составлял 39,7%; порошок с контролем – 46,2%.

Оценивая полученные результаты, считаем, что добавление сока или порошка гриба Шиитакэ значительно повысит терапевтическое

действие любого пробиотического препарата за счет повышения регенераторной способности лактобацилл после лиофилизации.

На основе полученных данных логично предположить возможность положительного эффекта воздействия на штаммы лактобацилл, входящих в состав АПК, за счет наличия в фармакологических формах (соке, порошке) гриба Шиитаке стимулирующих компонентов для ускорения процессов роста, развития и межвидового взаимодействия бактерий между собой.

Таблица 16 — Оценка влияния фармакопейных лекарственных форм гриба Шиитаке на развитие пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus*

Статистические параметры	Выросшие колонии на чашке КОЕ/мл		
	Биологически активные формы гриба Шиитаке		контроль
	сок	порошок	
М±m (КОЕ*10 ³)	7,32±0,47	7,66±0,42	5,24±0,49
Ст. отклонение	1,05*10 ³	0,93*10 ³	1,09*10 ³
n (количество экспериментов)	5	5	5
Процент стимуляции роста	39,7	46,2	-
Значение t-критерия Стьюдента	3,06	3,75	-
p относительно контроля	<0,05	<0,05	-
	Различия статистически значимы		
Значение t-критерия Стьюдента - 0,54 p сок / p порошок > 0,05 Различия статистически не значимы			

Полученные результаты относительно стимулирующего действия производных гриба Шиитаке (сок, порошок) на штаммы лактобацилл легли в основу нашего патента на изобретение РФ №2661737, опубл. в бюлл. изобр. №20, 19.07.18.

Данное стимулирующее действие также подтверждается в выполненных нами ранее экспериментах при изучении процессов микрокультивирования пробиотических штаммов лактобацилл с использованием сока гриба Шиитаке, где было обнаружено, что наблюдается аналогичное действие производных гриба Шиитаке на популяцию лактобацилл выделенного АПК.

С целью масштабирования процессов развития пробиотических штаммов лактобацилл в процессе микрокультивирования нами был выполнен эксперимент с переходом на большую по численности и сложности популяцию нескольких видов лактобацилл (выделенный нами АПК) с оценкой развития данной популяции с использованием нефелометрического метода. Данный метод позволяет быстро получить результаты относительно развития микробной популяции и охарактеризовать направленность адаптивного процесса изучаемого комплекса лактобацилл (АПК).

Нефелометрический метод оценки состояния бактериальной культуры является методом, способным отразить в целом реакцию популяции лактобацилл на добавление сока гриба Шиитаке. В связи с тем, что этим методом определяли интенсивность светового потока, т.е. коэффициент пропускания (мутность), в данных экспериментах нельзя использовать порошок гриба Шиитаке.

Поэтому в жидкую питательную среду MRS добавляли только сок гриба Шиитаке также в объеме 2,5%.

Данный эксперимент был выполнен в тройной повторности. Полученные данные развития лактобацилл АПК контрольного эксперимента и эксперимента с добавлением сока Шиитаке представлены в таблице 17, результаты эксперимента фиксировали через 24 часа после культивирования.

Регистрация изменения оптической плотности экспериментов в опыте относительно контроля составило 2,5 раза. Вместе с тем оптическая плотность развивающихся бактериальных культур имеет характер не прямой зависимости между количеством клеток и временными отрезками измерений

эксперимента, однако именно данный факт косвенно свидетельствует о стимуляции развития микробной популяции лактобацилл АПК под влиянием веществ сока гриба Шиитаке. В данном случае можно констатировать увеличение числа клеток лактобацилл из состава АПК, поскольку только в случае увеличения числа клеток будет существенно изменяться в сторону повышения оптическая плотность изучаемых бактериальных взвесей.

Таблица 17 — Определение влияния сока гриба Шиитаке на развитие лактобацилл АПК нефелометрическим методом

Показатели экспериментов	Коэффициент пропускания				Оптическая плотность АПК ($M \pm m$)	
	Номер эксперимента			Чистая MRS		Настройка прибора по H_2O дист.
	1	2	3			
контроль	24	23	25	81	100	0,62±0,02
опыт	3	4	4			1,52±0,04
Изменение оптической плотности экспериментов опыт/контроль в 2,5 раза						

Таким образом, установлена стимуляция лактобацилл, содержащихся в пробиотических препаратах и аутопробиотических комплексах как с соком, так и при добавлении порошка гриба Шиитаке. Это может быть рассмотрено как тенденция для разработки новых препаратов, содержащих биологические компоненты гриба Шиитаке.

Резюме. В ходе проделанной работы разработали способ получения аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл, который в настоящее время может применяться для восстановления, нарушенного микробиоценоза кишечника. Препарат аутопробиотик, содержащий лактобациллы, выделенные от конкретного индивидуума, будет использоваться для лечения и профилактики дисбактериоза кишечника. При этом лактобациллы не будут элиминироваться из организма человека, т.к.

они являются аутобиотой, а также не будут проявлять антагонистические отношения к другим микроорганизмам, находящимся в кишечнике.

После выделения АПК или получения готового к применению препарата аутопробиотика необходим контроль его качества. И с этим может справиться метод MALDI TOF, он показал возможность быстрого и надежного определения степени чистоты АПК, а также для заключительной оценки степени чистоты и качества относительно контаминационной безопасности.

В ходе исследований обнаружили разный процент совпадения молекулярной массы фрагментов макромолекул у генетически близких родственников разных возрастных групп. Установлено, что в исследованных парах детей в возрасте от 1 года до 5 лет наблюдается совпадение спектра $M_{ФМ}$ для выделенного комплекса лактобацилл в среднем на 49,9%, а у взрослых в возрасте 25 – 30 лет регистрируется его снижение до 30,5%. Это говорит о том, что даже у близких родственников видовой набор лактобацилл отличается.

Следовательно, микробиота кишечника каждого человека уникальна по своему микробному составу и использование препаратов пробиотиков, содержащих один или несколько штаммов лактобацилл, которые способны конкурировать с аутобиотой, нежелательно.

При введении препарата аутопробиотика перорально, находящиеся в нем живые лактобациллы должны пройти разные барьеры (желудочный сок), добраться до толстого кишечника в достаточном количестве и не погибнуть. Поэтому для повышения выживаемости, стимуляции роста и развития лактобацилл в готовых препаратах АПК мы успешно использовали природные активные добавки (сок или порошок) высшего гриба Шиитакэ.

Практически невозможно в промышленном масштабе получить универсальные пробиотики, подходящие каждому индивидууму, для поддержания нормальной микробиоты, а необходимо подбирать микроорганизмы индивидуально каждому человеку. В связи с этим

оптимально получать и использовать штаммы микроорганизмов из состава аутокультур, т.е. аутопробиотиков для коррекции и сохранения микробного гомеостаза микробиоты кишечника.

Выполненные нами эксперименты с длительным хранением выделенного АПК в течение 2 лет в условиях низкой температурной криоконсервации однозначно свидетельствуют о возможности создания банка АПК с последующим их накоплением и пополнением. Зарегистрировано сохранение их высокой жизнеспособности и активности, что, несомненно, представляет интерес для последующего создания продуктов функционального питания для лечения и профилактики заболеваний ЖКТ индивидуального использования.

Данные эксперименты также показали возможность быстрого, надежного и экономически малозатратного процесса масштабирования при получении готового молочнокислого продукта с содержанием лактобацилл в высоком титре (концентрации – 10^7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В организации живого в основном различают молекулярный, клеточный, тканевой, органный, организменный, популяционный, видовой, биоценотический и биосферный уровни. Каждый из этих уровней характеризуется особенностями, присущими другим уровням, но каждому уровню присущи собственные специфические особенности.

У бактерий часто изучают клеточный, популяционный и видовой уровни организации. Клеточный уровень организации бактерий представлен клетками, действующими в качестве отдельных самостоятельных организмов. Объединение одиночных клеток, которые практически никогда не существуют изолированно, ведет к следующей иерархической единице - популяции. В данном случае ряд авторов выделяют не просто популяции клеток, а микропопуляции, которые изучаются на микроскопическом уровне [198], а также по генетическому различию генома [69]. Создавая надорганизменную систему, популяции характеризуются определенным генофондом и определенным местом обитания [143]. Однако подобные исследования столь масштабны и экономически затратны, что, как правило, этот уровень изучения возможен только при значительных экологических нарушениях до и после наступившего явления.

Проще для изучения подобных морфо-биологических образований использовать реконструктивный подход: клетка – сообщество клеток – микроколония – колония. В данном случае изучаются как отдельные клетки и их образования – колонии, так и реакции развивающихся клеточных культур относительно друг друга. И в данном случае принято говорить о клеточно-популяционном уровне изучения микроорганизмов. Особенно это проявилось при изучении важного и интересного этапа взаимодействия клеток и популяций микроорганизмов: создания биопленок на поверхностях плотных субстратов как абиотической, так и биотической природы [125].

В популяциях микроорганизмов начинаются элементарные эволюционные преобразования, которые приводят к выработке адаптивно

приспособленных форм. Организм человека представляет собой малоизученный микрокосм, который в целом сам по себе мало изучен, несмотря на все полученные нами до этого знания.

Микробное разнообразие кишечника велико и может достигать, по некоторым оценкам, 3-5 тысяч видов микроорганизмов, причем многие виды лактобацилл еще даже не изучены [116], содержащиеся в ЖКТ, в том числе.

Одним из важных экотопов человека является ЖКТ, а именно толстый кишечник. Популяционный состав видов, обитающих в ЖКТ, чрезвычайно разнообразен. В составе одного вида может быть от одной до многих тысяч популяций, представители которых характеризуются самым различным местообитанием и занимают разные экологические ниши. Виды представляют собой результат эволюции и характеризуются высокой частотой изменчивости внутри вида, и их сменяемостью в качестве ведущих видов в ассоциациях.

Как мы отмечали ранее, исследование отдельных клеток бактерий во время их развития – сложный и трудоемкий процесс, поэтому изучение отдельных представителей (видов) молочнокислых бактерий из состава ЖКТ чаще выполняют, исследуя популяции лактобацилл с большим представительством клеток с последующим выходом на их промышленное культивирование для получения молочнокислых продуктов.

В доступной нам научной литературе крайне мало представлено информации о начальных стадиях развития лактобацилл. В связи с этим нами были проведены эксперименты на клеточном, клеточно-популяционном и популяционных уровнях с постепенным переходом изучения по уровням биологической организации лактобацилл.

Для изучения бактерий на популяционном и видовом уровнях нами были использованы методы оценки биосовместимости и антагонизма лактобацилл и ряда тест-культур УПМ, которые обычно используются для экспериментов, по оценке устойчивости микробных штаммов тела человека. Данные эксперименты были выполнены на чашках Петри с искусственной

питательной средой с некоторыми нашими изменениями классического варианта (Рац. предл. №2507, ИвГМА, 2012).

Так, обнаружено, что испытуемый штамм лактобацилл *L.acidophilus* из препарата Лактобактерин не подавляет большинство тест–культур УПМ, взятых в эксперимент, а проявляет по отношению к ним биосовместимость, кроме того, также проявляет чувствительность к *Klebsiella spp.* В связи с этим можно говорить о том, что при совместном культивировании на плотной питательной среде штамм *L.acidophilus* проявляет слабый антагонизм к условно-патогенным микроорганизмам. Он обладает слабой антагонистической активностью в отношении обычно выступающих как транзиторные микроорганизмы (использованные нами тест-культуры) для ЖКТ. Поэтому можно ожидать, что и другие пробиотические лактобациллы проявляют индивидуальную антагонистическую активность в отношении отдельных представителей кишечной микробиоты. Методом определения биосовместимости и антагонизма на чашках можно изучить лишь непосредственное взаимоотношение отдельных видов и штаммов бактерий между собой.

Таким образом, чашечный метод можно представить, как качественный метод, который зачастую не может показать однозначно, насколько культуры микроорганизмов количественно биосовместимы или проявляют антагонизм в отношении друг друга. Как видно из этих данных, популяционный и культуральный подход в изучении биосовместимости и антагонизма не вполне приемлем, поскольку ему не хватает чувствительности по характеристике адаптивной реакции отдельных клеток популяции.

Проследить за развитием каждой отдельной бактериальной клетки можно, если использовать метод микрокультивирования в камерах различной конструкции (стационарных и проточных) с использованием светового микроскопа. В данных камерах определяли время генерации лактобацилл в оптимальных условиях культивирования, а также биосовместимость или антагонизм нескольких бактериальных культур при совместном

культивировании. При использовании метода микрокультивирования нами было количественно определено не только действие биосовместимости и антагонизма самих микроорганизмов, но и степень воздействия различных биологически активных веществ, которые в свою очередь действуют как стимуляторы роста или подавляют изучаемую культуру лактобацилл.

Установлено, что метод микрокультивирования способен довольно объективно оценить процесс адаптации клеток к среде обитания в разных режимах культивирования на ранних (начальных) стадиях контакта с плотной питательной средой в процессе культивирования. Тем самым этот метод может быть применен для выявления динамических характеристик роста и развития отдельных клеток.

В ходе работы при использовании метода микрокультивирования нами было установлено, что наиболее оптимальным и интегральным показателем для оценки физиологического состояния клеток бактериальных популяций может быть использовано время генерации, рассчитываемое для первых двух поколений клеток.

В процессе совместного микрокультивирования клеток пробиотического штамма *L.acidophilus* с некоторыми УПМ нами обнаружено различное адаптивное поведение изучаемого штамма, которое регистрируется под воздействием клеток УПМ. Полученные результаты позволяют констатировать, что в ходе экспериментов время генерации второго поколения клеток не увеличилось под действием грибов рода *Candida*: контроль — 123 ± 3 минут, опыт — 120 ± 3 минут. Это свидетельствует о том, что культура *Candida sp.* не оказывает антагонистического влияния на развитие лактобацилл и является с ней биосовместимой. Вероятней всего, это связано с постоянным присутствием в норме в ЖКТ грибов рода *Candida sp.* и проявлением эволюционно сформированной толерантности данных видов (лактобацилл и грибов рода *Candida sp.*) между собой.

Проведенные исследования антагонистической активности в экспериментах с *S.aureus N-3* показывают, что время генерации второго поколения лактобацилл не увеличилось под действием выделяемых им ферментов (в пределах интервала видеосъемки - 10 минут) – контроль — 123 ± 3 минут, опыт — 125 ± 4 минут (# - отличия не выявлены). Следовательно, можно говорить о том, что штамм *S.aureus N-3*, взятый в эксперимент, не проявляет антагонизм в отношении исследуемой культуры лактобацилл, поскольку не задерживает рост и развитие клеток *L.acidophilus*.

Кроме того, методом микрокультивирования обнаружено, что лактобациллы из препаратов и функциональных продуктов питания обладают различным спектром антагонистической активности при совместном культивировании в отношении друг друга. Полученные данные позволяют говорить о наличии высокой антагонистической активности штамма *L.rhamnosus LGG* на штамм *L.acidophilus*, т.к. время генерации (τ) второго поколения существенно увеличилось (с 123 ± 3 минут в контроле до 212 ± 3 минут). Также обнаружено, что антагонистическое воздействие штамма *L.acidophilus NK1* в среднем увеличило время генерации второго поколения клеток штамм *L.acidophilus* до 161 ± 4 минуты по сравнению с контролем 123 ± 3 минуты. Антагонистическое воздействие штаммов *L.rhamnosus* и *L.casei DN-113001* на клетки штамма *L.acidophilus* в ходе совместного микрокультивирования можно расценить как низкое т.к. τ увеличились всего до 143 ± 2 минуты. Причем статистические расчеты показывают, что все изменения признака (времени генерации для клеток изучаемого штамма лактобацилл *L.acidophilus*) достоверно неразличимы: число степеней свободы (f) равно 3, парный t-критерий Стьюдента равен 1,83, критическое значение t-критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы составляет 3,18 $t_{\text{набл}} < t_{\text{крит}}$, изменения признака статистически не значимы $p = 0,21$.

Таким образом, на основании этих данных можно предположить, что штамм *L.acidophilus* является полностью биосовместимым с *L.casei DN-114001 defensis*, поэтому они могут выращиваться совместно в дальнейшем при масштабировании биотехнологических процессов. В связи с вышеизложенным можно сделать вывод, что необходим тщательный подбор штаммов для совместного использования в приготовлении новых препаратов для коррекции нарушений микробиоты кишечника.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что метод совместного микрокультивирования лактобацилл с использованием фазовоконтрастной световой микроскопии позволяет быстро (6 – 8 часов) оценивать наличие или отсутствие биосовместимости для изучаемых штаммов.

Одной из важных проблем биосовместимости является установление взаимовыгодных отношений между микроорганизмами и особенностей регистрации этого процесса. Метод микрокультивирования бактериальных клеток предоставляет такую возможность, особенно в случае положительной адаптивной реакции (стимуляции роста и развития) популяции. В природе существуют биологически активные вещества, которые стимулируют развитие клеток лактобацилл (пектин) [148].

Одним из интересных биологически активных веществ для лактобацилл, на наш взгляд, являются производные гриба Шиитаке. Метод микрокультивирования лактобацилл, использованный нами, позволяет осуществить прямую оценку воздействия этих веществ на изучаемые клетки *in vitro*. Поскольку обычно в ряде статей указывается опосредованное воздействие на микробиоту через активацию клеток иммунной системы, в частности, активация фагоцитарной активности, а также повышение синтеза интерферонов и провоспалительных цитокинов. Достоверно известно, что в соке Шиитаке содержатся одновременно вещества, которые обладают как антимикробным избирательным действием [4], так и действием на активацию клеточного иммунитета [43].

Методом микрокультивирования нами впервые было определено прямое стимулирующее действие биологически активного вещества (сок), полученного из гриба Шиитаке, на клетки лактобацилл. Полученные данные свидетельствуют, что под действием сока время генерации второго поколения бактериальных клеток сократилось на 10% относительно контроля. Полученные данные свидетельствуют, что под действием сока гриба *Shiitake* время генерации второго поколения бактериальных клеток сократилось для *L.acidophilus* с 115 ± 3 минут до 103 ± 1 минут, *L.rhamnosus* LGG с 127 ± 3 мин. до 120 ± 1 мин., *L.casei* DN-114001 *defensis* с 132 ± 2 до 120 ± 1 мин., *L.acidophilus* NK1 с 159 ± 2 до 134 ± 2 мин., *L.rhamnosus* и *L.casei* с 143 ± 2 до 129 ± 1 минут, и, следовательно, это позволяет сделать вывод, что сок Шиитаке стимулирует рост клеток лактобацилл.

Микроорганизмы в составе микробиоты ЖКТ постоянно находятся под воздействием неспецифических факторов защиты организма человека. Нами с помощью различных методов (микрокультивирование и нефелометрический методы) было предпринято исследование действия слюны человека как комплекса иммунозащитных веществ (лизоцим, IgA) на некоторые виды микроорганизмов. Результаты экспериментов при изучении отдельных клеток методом микрокультивирования свидетельствуют, что при добавлении в питательную среду стерильной слюны человека существенного увеличения времени генерации второго поколения для лактобацилл не произошло (все в пределах временного интервала 10 минут). Однако при внесении дополнительно системы комплемента в среду со слюной время генерации клеток существенно изменилось. Для *L.rhamnosus* LGG и *L.casei* DN-114001 *defensis* время генерации клеток второго поколения увеличилось практически на час (64 и 56 мин. соответственно), для *L.acidophilus* на 34 мин., *L.rhamnosus* и *L.casei* на 19 мин., а *L.acidophilus* NK1 так же, как и в случае с добавлением только слюны, время деления клеток сократилось в среднем на 6 мин. ($p < 0,001$).

При изучении популяции лактобацилл использовали нефелометрический метод исследования. Обнаружено, что в популяции представителей лактобацилл из состава пробиотических препаратов после обработки стерильной слюной человека происходит активная элиминация части клеток бактериальной популяции.

На наш взгляд, это происходит вследствие того, что в данном случае наблюдается работа «иммунологического фильтра» *in vitro*. В пользу данного предположения можно привести следующие данные литературы. Иммуноглобулины, прежде всего секреторный IgA, препятствуют адгезии к стенкам кишечника и тем самым способствуют выведению чужеродных микроорганизмов во внешнюю среду. Подтверждением роли секреторного IgA в предотвращении колонизации слизистых посторонними микроорганизмами является тот факт, что 99% бактерий (представителей индигенной анаэробной флоры) не покрыты секреторными иммуноглобулинами. В то же время обнаружен феномен иммунологической толерантности к индигенной микробиоте [150], когда транзиторные энтеробактерии, энтерококки и другие бактерии кишечника полностью покрыты IgA. Обнаружено, что слизистые желудочно-кишечного тракта начинают реагировать на вводимые микроорганизмы синтезом IgA только тогда, когда количество микроорганизмов составляет 10^6 и более клеток на грамм содержимого кишечника.

Учитывая этот факт, можно считать, что микроорганизмы в концентрациях менее 10^6 КОЕ/мл являются малозначимыми для оказания воздействия на физиологические изменения в организме данного живого организма. Это происходит из-за явления Quorum Sensing'a (кворум сенсинга) для лактобацилл только по достижению пороговой концентрации более 10^6 КОЕ/мл [152].

Таким образом, предлагаемый нами «иммунологический фильтр», по нашему представлению, имеет следующий механизм действия: чужеродный микроорганизм, попавший в ротовую полость, изначально связывается с IgA

и впоследствии атакуется системой комплемента слюны конкретного индивидуума. В то же время с микроорганизмами из состава собственного микробиоценоза (представители аутобиоты) такого связывания не происходит, что позволяет селекционировать микроорганизмы из состава аутомикробиоты хозяина. Кроме того, во время выделения аутоштаммов лактобацилл происходит разбавление исходного объема используемого материала (фекалий) и соответственно УПМ микробиоты до несущественных значений, в то время как концентрация лактобацилл остается в высоком титре разведения $10^{-7} - 10^{-8}$ (см. Приложение рисунки 3, 4).

На основании всех представленных данных можно предположить: чем меньшее воздействие оказывает комплекс антимикробных факторов врожденного иммунитета, содержащегося в слюне, тем большее сродство имеет данный штамм лактобацилл по биосовместимости для конкретного индивидуума. Комплекс гуморальной защиты близких родственников совпадает для них, и эффекторным компонентом слюны в данном случае служит секреторный IgA, что является прямым подтверждением сделанного нами ранее предположения о реальном существовании «иммунологического фильтра». На основании полученных данных этот «фильтр», несомненно, работает и оказывает, практически, одинаковое воздействие у близких родственников ($p < 0,05$).

Таким образом, можно с уверенностью утверждать об индивидуальной чувствительности отдельных штаммов лактобацилл к антимикробным факторам иммунной защиты, представленным в слюне каждого конкретного человека (лизоцим, комплемент, IgA), и тогда в дальнейшем для коррекции микробиоты необходимо использовать только те штаммы, которые нечувствительны с позиций ингибирования к иммунной защите данного индивидуума, т.е. они являются «иммунологически толерантными».

В связи с этим было крайне интересно определение адаптивной реакции лактобацилл при взаимодействии с гуморальными факторами у близких родственников и чужих людей. Установлено, что при определении

коэффициента корреляции развивающихся популяций клеток лактобацилл при добавлении слюны родственников превалирует сильная и очень сильная связь между признаками, приближенная к единице, однако встречается и отрицательная корреляция (очень слабая связь, 3 значения из 20). При использовании слюны другого человека (не родственника) на эти же штаммы лактобацилл чаще всего встречается умеренная и значительная связь между признаками и отрицательная (6 значений из 20).

Высокий коэффициент корреляции позволяет сделать вывод об одинаковых физиологических структурных перестройках использованных штаммов лактобацилл под действием антимикробных факторов защиты у близких родственников на временном промежутке в 3 часа. Низкий коэффициент корреляции для чужих людей свидетельствует о непредсказуемой адаптивной реакции клеток популяций лактобацилл, что выражается в разнонаправленном процессе роста или гибели клеток.

Установленная нами однотипная адаптивная реакция для лактобацилл у близких родственников под воздействием гуморальных факторов защиты слюны позволяет использовать эти штаммы внутри семейной группы в лечении и профилактике заболеваний ЖКТ.

Для восстановления, нарушенного микробиоценоза одним из распространенных приемов является введение человеку в больших количествах антагонистических штаммов лактобацилл в составе препаратов пробиотиков.

Эти препараты и продукты питания, сделанные на основе живых микроорганизмов, являются эффективными лечебно-профилактическими средствами [132]. Однако с расширением спектра показаний для назначения пробиотиков накапливается информация, что положительный эффект пробиотиков нередко носит временный характер или полностью отсутствует [110]. Поэтому в ходе работы разработали способ получения аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл (Кузнецов О.Ю. и др., Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и

лактобациллы №2505304, 27.01.2014), с использованием обоснованного нами ранее воздействия «иммунологического фильтра» и общепринятыми бактериологическими методиками выделения лактобацилл на селективных питательных средах. Контроль за микробным представительством штаммов полученного аутопробиотика обычно осуществляют согласно общепринятым методам посева на различные плотные питательные среды: Эндо, Плоскирева, ЖСА и др. – для определения присутствия посторонней микробиоты.

Полученный аутопробиотический комплекс (АПК) в настоящее время может применяться для восстановления, нарушенного микробиоценоза кишечника. Однако в ходе его получения чрезвычайно важно и необходимо быстро убедиться в полной «чистоте» готового выделенного АПК для последующего его возможного масштабирования или размещения на длительное хранение, а также его непосредственного быстрого применения.

Сделать это в настоящее время представляется возможным только с использованием метода MALDI TOF масс-спектрометрии, поскольку именно он может служить в качестве быстрого референсного экспресс-метода оценки готовности выделяемых аутопробиотических комплексов. С помощью метода MALDI TOF одновременно возможно подтвердить присутствие в АПК активных лактобацилл, а также провести заключительную оценку степени чистоты и качества относительно контаминационной безопасности. Использование метода MALDI TOF позволило нам выполнить сравнительные исследования спектров макромолекул штаммов лактобацилл, входящих в состав пробиотических препаратов, которые можно использовать для определения родовых признаков. Как установлено нами, это (спектр макромолекул) можно применить для сравнения различных видов лактобацилл как лиофильно высушенных препаратов, так и жидких, выделенных нами аутопробиотических комплексов.

Полученные нами данные в целом открывают перспективу использования метода MALDI TOF для дальнейшего сравнительного анализа

выделяемых аутопробиотических комплексов лактобацилл у близких родственников разного возраста.

Так, установлено, что в исследованных парах детей близких родственников в возрасте от 1 года до 5 лет наблюдается совпадение пиков в спектре $M_{ФМ}$ для выделенного комплекса лактобацилл на 49,9%, а у взрослых в возрасте 25 – 30 лет регистрируется его снижение до 30,5%. Поэтому, на наш взгляд, необходим индивидуальный подбор аутоштаммов лактобацилл для достижения максимально положительного эффекта в лечении и профилактике заболеваний ЖКТ, в том числе и инфекционной природы, даже среди генетически близких родственников разного возраста. Значения t -критерия Стьюдента для вариационных рядов – 18,54 при $p < 0,05$.

После выделения АПК и определения его безопасности существует настоятельная необходимость в его сохранении, а также при необходимости быстрого накопления биологической массы. Для этого комплекс живых лактобацилл (АПК) расфасовывался нами с соблюдением правил асептики в стерильные ампулы в равном объеме (1 мл) и при количестве микроорганизмов с титром не менее 10^7 КОЕ/мл, а затем замораживался (-20°C) для приостановки физиологических процессов. Далее с целью получения готового молочнокислого продукта с содержанием АПК конкретного индивидуума содержимое одной из ампул (3% от объема молока) помещали в необходимый объем молока без предварительного размораживания и инкубировали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 – 48 часов для накопления необходимого объема биомассы АПК лактобацилл.

Полученные нами данные однозначно свидетельствуют о возможности получения консервированной формы препарата в виде замороженного бактериального АПК (препарата). Установлено, что данный препарат содержит живые лактобациллы без потери их жизнеспособности (не менее 2 лет), судя по динамике изменения оптической плотности (D) через 24 и 48 часов культивирования - ($D = 0,26 \pm 0,01$ и $D = 1,11 \pm 0,01$ соответственно) нефелометрическим методом и подтвержденному бактериологическому

исследованию относительно отсутствия контаминации посторонними микроорганизмами. Таким образом, согласно представленным ранее данным можно констатировать тот факт, что при использовании криоконсервированного АПК возможно быстрое выполнение масштабирования необходимого объема индивидуального молочнокислого продукта на основе АПК индивидуума лактобацилл, что имеет важное значение для лечения и профилактики заболеваний ЖКТ.

Данные этих экспериментов показали возможность быстрого, надежного и экономически малозатратного процесса масштабирования при получении готового продукта с высоким содержанием лактобацилл в высоком титре концентрации более – 10^7 (Протокол исследований №б/н от 22 июня 2018 г. и Протокол исследований №б/н от 31 августа 2018 г. Испытательной микробиологической лаборатории Росстандарта, г. Иваново). Длительное хранение лактобацилл без потери их жизнеспособности и активности дает в перспективе возможность создания индивидуального криобанка АПК лактобацилл с быстрым получением необходимого количества продуктов функционального питания для дальнейшего применения.

При введении перорально препарата аутопробиотика находящиеся в нем живые лактобациллы должны пройти разные барьеры: желудочный сок, адгезивные свойства стенок кишечника, воздействие биологически активных веществ микробиоты в целом – чтобы достичь толстого кишечника в достаточном количестве и, главное, не погибнуть! Поэтому для повышения выживаемости, стимуляции роста и развития лактобацилл в готовых препаратах пробиотиков и аутопробиотиков нами успешно апробированы природные активные добавки высшего гриба Шиитаке.

В экспериментах использовали в качестве стимулятора роста лактобацилл из состава препарата «Лактобактерин» фармакологические формы высшего съедобного гриба Шиитаке, а именно: стерильный натуральный сок и порошок 2,5% от количества питательной среды. Процент

увеличения КОЕ*10³/мл *L.acidophilus* с добавлением сока по сравнению с контролем составляет 39,7%, порошок с контролем – 46,2%. Полученные результаты относительно стимулирующего действия производных гриба Шиитакэ (сок, порошок) на лактобациллы легли в основу нашего патента на изобретение РФ №2661737, опублик. в бюлл. изобр. №20, 19.07.18.

После успешно проведенных экспериментов относительно возможной стимуляции биологически активными веществами гриба Шиитакэ пробиотического штамма *L.acidophilus* было чрезвычайно интересно установить наличие аналогичного воздействия на лактобациллы, входящие в состав АПК. Регистрацию изменений оптической плотности проводили методом нефелометрии в сопоставлении с оценкой жизнеспособности по КОЕ. Данные экспериментов показали увеличение оптической плотности в опыте относительно контроля в 2,5 раза $p < 0,05$, контроль $D = 0,62 \pm 0,02$, опыт $D = 1,52 \pm 0,04$. В данном случае можно говорить об увеличении биомассы лактобацилл АПК при культивировании в селективной питательной среде. Это подтверждается увеличением числа клеток лактобацилл АПК (контроль – $2,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, опыт – $4,24 \cdot 10^7$ КОЕ/мл), что свидетельствует о стимуляции развития микробной популяции лактобацилл АПК.

Таким образом, установлена стимуляция лактобацилл, содержащихся в пробиотических препаратах и аутопробиотических комплексах, как с соком, так и при добавлении порошка гриба Шиитакэ. Что позволяет говорить о совпадении данных по жизнеспособности, полученных различными методами (установление КОЕ и оптической плотности) при развитии микробной популяции лактобацилл.

Из-за уникального микробного состава кишечника практически невозможно в промышленном масштабе получить универсальные пробиотики, подходящие для каждого индивидуума, лучше подбирать микроорганизмы индивидуально каждому человеку даже среди близких родственников. В связи с этим оптимально получать и использовать штаммы

микроорганизмов из состава аутобиоты, т.е. аутопробиотиков для коррекции и сохранения микробного гомеостаза микробиоты кишечника.

Представленная работа касается всех уровней изучения развития лактобацилл в ходе их культивирования от единичных клеток до популяций. Причем на популяционном уровне нами предприняты попытки изучения не только единичных популяций отдельных видов, но и совокупности различных видов, которые были выделены и использованы в проведенных нами экспериментах с необходимым количеством повторностей от нескольких индивидуумов.

Полученные результаты работы свидетельствуют о возможности получения, как самих АПК, так и продуктов функционального питания, произведенных на их основе. В связи с этим считаем весьма перспективным направлением дальнейшей работы создание индивидуального криобанка АПК для заинтересованных лиц, «деPOSITные вклады» АПК которых могут способствовать поддержанию микробного гомеостаза кишечника, как в норме, так и при различных нарушениях для конкретных индивидуумов.

Сочетанное использование экспериментов, проведенных на различных уровнях изучения лактобацилл при различных режимах их культивирования, позволило нам достичь новых результатов и подходов для их культивирования при последующих процессах биологического масштабирования с целью получения продуктов индивидуального функционального питания для лечения и профилактики нарушений гомеостаза микробиоты кишечника человека.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в оптимальных условиях микрокультивирования лактобацилл наиболее информативным показателем физиологического состояния их популяции являлось время генерации второго поколения клеток.

2. Показано, что кроме антагонизма по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, производственный штамм *L. acidophilus* в условиях совместного микрокультивирования лактобацилл обладал биосовместимостью с *L. casei* DN-114001 *defensis*, а также антагонистическим действием на *L. rhamnosus* LGG (увеличение времени второй генерации клеток на 100 мин).

3. Выявлено, что защитные антимикробные факторы слюны у генетически близких родственников оказывали на лактобациллы статистически равнозначное влияние, а у не состоявших в родстве людей отмечена коррелятивная связь показателей низкого уровня.

4. Впервые разработан приоритетный способ получения аутопробиотического комплекса, содержащего аутоштаммы лактобацилл человека.

5. Метод MALDI TOF рекомендуется использовать как референсный экспресс-метод оценки чистоты аутопробиотических комплексов лактобацилл.

6. Впервые установлен стимулирующий эффект (до 46,2%) гриба Шиитаке (*Lentinus edodes* F280) в отношении роста культур аутопробиотического комплекса лактобацилл.

7. Установлено, что использование криоконсервации аутопробиотического комплекса лактобацилл при минус 20 °С позволяет сохранить жизнеспособность лактобацилл в течение двух лет (срок наблюдения).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК – аутопробиотический комплекс

АПКв – аутопробиотический комплекс взрослых

АПКд – аутопробиотический комплекс детей

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колониобразующие единицы

$M_{\text{ФМ}}$ – молекулярная масса фрагментов макромолекул

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

СКДТ – стационарная камера диффузного типа

К – комплемент

УПМ – условно-патогенные микроорганизмы

ФПП – функциональные продукты питания

D – оптическая плотность

τ — время генерации клеток

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные вопросы акушерства и гинекологии / В. В. Бахаев, И.Е. Роткина, Л. М. Грачева // Материалы юбилейной конференции, посвященной 15-летию кафедры акушерства и гинекологии факультета усовершенствования врачей АГМУ. – Барнаул, 2001. – С. 19–20.
2. Алешкин, А. В. Видовой состав лактобацилл, выделенных от людей с дизбактериозами кишечника / А. В. Алешкин // Материалы VIII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2002. – Т. 1. – С. 127–128.
3. Антимикробное действие гриба *Lentinus edodes* на микробиоту человека / О. Ю. Кузнецов, Е. В. Милькова, А. Е. Соснина, Н. Ю. Сотникова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 1. – С. 80–82.
4. Ардацкая, М. Д. «Дисбактериоз» кишечника: понятие, диагностические подходы и пути коррекции. Возможности и преимущества биохимического анализа кала : пособие для врачей / М. Д. Ардацкая, О. Н. Минушкин, Н. С. Иконников. – М., 2004. – 56 с.
5. Артеменко, К. А. Масс-спектрометрическое de novo секвенирование пептидов / К. А. Артеменко, Т. Ю. Самгина, А. Т. Лебедев // Масс-спектрометрия. – 2006. – №3 (4). – С. 225–254.
6. Ацидофильные лактобациллы и их значение в системе средств, регулируемых бактериоценоз / В. В. Поспелова, М. А. Манвелова, Н. Г. Рахимолова // Медицинские аспекты микробной экологии / под ред. Б. А. Шендеров. – М., 1991. – С. 175–182.
7. Блинкова, Л. П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления / Л. П. Блинкова // Микробиология. – 2003. – № 3. – С. 109–113.
8. Бондаренко, В. М. Дисбактериоз кишечника как клинко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – С. 304.

9. Бондаренко, В. М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией / В. М. Бондаренко, А. А. Воробьев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 1. – С. 84–92.
10. Бондаренко, В. М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В. М. Бондаренко, Н. М. Грачева // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56–63.
11. Бондаренко, В. М. Прикладные аспекты молекулярной биологии бифидобактерий и лактобацилл / В. М. Бондаренко // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 2. – С. 89–97.
12. Бондаренко, В. М. Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека / В. М. Бондаренко. – М., 2007. – С. 9–10.
13. Бухарин О.В. Персистенция бактериальных патогенов как физиологический феномен / О.В. Бухарин // Вестник московского университета. Сер. 16. Биология. - 2008. – № 1. – С. 6-13.
14. Влияние *Lactobacillus acidophilus* «SOLCO» на иммунологические показатели тотально деконтаминированных мышей в условиях общей гнотобиологической изоляции / В. В. Смеянов, Н. Н. Мальцева, W. Bosart, В. М. Коршунов // Микробиология. – 1992. – № 11–12. – С. 12–15.
15. Воскун, С. Е. Структура популяции *Shigella flexneri* в процессе формирования микроколоний / С. Е. Воскун, С. Г. Смирнов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1984. – № 6. – С. 29–31.
16. Гавжа, С. И. Анализ клинико-иммунологического статуса полости рта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом лёгкой и средней степени тяжести при использовании антибактериальных средств / С. И. Гавжа, А. И. Вронина, О. В. Шкаредная // Стоматология. – 2010. – Т 89, № 3. – С. 30–33.

17. Гинцбург, А. Л. «Quorum sensing», или социальное поведение бактерий. / А. Л. Гинцбург, Т. С. Ильина, Ю. М. Романова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. № 5. – С. 86–93.
18. Гинцбург, А. Л. Социальное поведение бактерий / А. Л. Гинцбург // Медицинская газета. – 2006. – № 62. – 18 с.
19. Глушанова, Н. А. Биосовместимость пробиотических и резидентных лактобацилл. / Н. А. Глушанова, А. И. Блинов // Тезисы VII Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2005» // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2005. – № 1–2. – С. 31.
20. Грузина, В. Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В. Д. Грузина, // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – № 48 (10). – С. 32–39.
21. Ермоленко, Е. И. Антимикробное действие лактобацилл / Е. И. Ермоленко, О. В. Рыбальченко // Медицина. XXI век. – 2007. – № 5 (6). – С. 41–48.
22. Заквасочные культуры лактобацилл – продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот / А. В. Олескин, О. Г. Жиленкова, Б. А. Шендеров // Молочная промышленность. – 2014. – № 9. – С. 42–43.
23. Значение пребиотиков для функционирования кишечной микробиоты: клинический опыт применения препарата Дюфалак (лактозула) / В. А. Малкоч, С. В. Бельмер, М. Д. Ардацкая, О. Н. Минушкин // Детская гастроэнтерология. – 2006. – № 5. – С. 2–8.
24. Изучение антагонистического действия лактобацилл на *Helicobacter pylori* / Л. Г. Баженов, В. М. Бондаренко, Е. А. Лыкова, Д. К. Огай // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – № 3. – С. 89–91.
25. Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bifidobacterium* кишечной микробиоты с использованием метода MALDI TOF масс-спектрометрии / А. В. Чаплин, А. Г. Боржовский, Т. В. Парфенова Л. И.

Кафарская, Н. Н. Володин, А. Н. Шкопоров, Е. Н. Ильина, Б. А. Ефимов // Вестн. РАМН. – 2015. – № 70 (4). – С. 435–439.

26. Ильина, Е. Н. Прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование бактериальных белков для индикации и характеристики патогенов / Е. Н. Ильина // Acta Naturae. – 2009. – № 1. – С. 115–121.

27. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / под ред. Г. Г. Онищенко, В. А. Алешкина, С. С. Афанасьева, В. В. Поспеловой. – М. : ГОУ ВУНМЦ Минздрава России, 2002. – 608 с.

28. К механизму антагонистической активности лактобацилл / М. В. Тюрин, Б. А. Шендеров, Н. Г. Рахимова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1989. – № 2. – С. 3–8.

29. Камера для проточного культивирования микроорганизмов и клеток ткани: а. с. 1339123 СССР / О. Ю. Кузнецов. – № 3954951/31-13 ; заявл. 16.09.86; опубл. 23.09.1987. Бюл. № 35. – 3 с.

30. Кардашова, Е. В. Ингибиторы протеолитических ферментов, продуцируемые лактобактериями. Проблемы медицинской биотехнологии и иммунологии инфекционных болезней / Е. В. Кардашова, Е. М. Горская // Сборник трудов МНИИ им. Г.Н. Габричевского. – М., 1996. – Т. 2. – С. 113–118.

31. Корниенко, Е. А. Современные принципы выбора пробиотиков / Е. А. Корниенко // Детские инфекции. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 63–68.

32. Коршунов, В. М. Проблема регуляции микробиоты кишечника / В. М. Коршунов // Микробиология. – 1995. – № 3. – С. 48–53.

33. Куваева, И. Б. Микроэкология и иммуноглобулины пищеварительных секреторных копрофильтратов человека в норме и при патологии / И. Б. Куваева, Т. Л. Темкина, М. А. Виноградова // Вестн. АМН СССР. – 1975. – № 12. – С. 70–77.

34. Кузнецов, О. Ю. Бактериальная колония как сложно организованное сообщество клеток / О. Ю. Кузнецов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 2. – С. 3–7.
35. Кузнецов, О. Ю. Выбор информативных показателей для характеристики адаптивного процесса в популяции палочковидных бактерий / О. Ю. Кузнецов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 6. – С. 13–18.
36. Кузнецов, О. Ю. Колонизационная активность популяций прокариотов и микроскопических эукариотов : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.00.07 / Кузнецов Олег Ювенальевич. – М., 2005. – 46 с.
37. Лакин, Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для университетов и педагогических институтов / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1973. – 343 с.
38. Лебедев, К. А. Иммунология образ распознающих рецепторов. Интегральная иммунология / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М., 2013. – 256 с.
39. Мазанкова, Л. Н., Пробиотики: характеристика препаратов и выбор в педиатрической практике / Л. Н. Мазанкова, Е. А. Лыкова // Детские инфекции. – 2004. – № 1. – С. 18–23.
40. Мелкумян, А. Р. Влагилищные лактобациллы – современные подходы к видовой идентификации и изучению их роли в микробном сообществе / А. Р. Мелкумян, Т. В. Припутневич // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 7. – С. 18–23.
41. Метаболический профиль бифидофлоры при различных состояниях биотопа толстого кишечника человека / О. В. Бухарин, Е. В. Иванова, Н. Б. Перунова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. № 1. С. 3–11.
42. Микробиота пищеварительного тракта / под ред. А. И. Хавкина. – М.: Фонд социальной педиатрии, 2006. – С. 416.

43. Милькова, Е. В. Характеристика иммуномодулирующей и антимикробной активности биокomпонентов высшего съедобного гриба Шиитакэ (*Lentinus edodes*): автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.36, 03.00.07 / Милькова Екатерина Владимировна. – М., 2002. – 25 с.
44. Николаев Ю. А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю. А. Николаев, В. К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – № 76(2). – С. 149–163
45. Николаев, Ю. А. Дистантные информационные взаимодействия у бактерий / Ю. А. Николаев // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 597–605.
46. Олескин, А. В. Биосоциальность одноклеточных (на материале исследований прокариот) / А. В. Олескин // Журн. общей биологии. – 2009. – Т. 70, № 3. – С. 225–238.
47. Олескин, А. В. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота – хозяин: роль нейромедиаторов / А. В. Олескин, Г. И. Эль-Регистан, Б. А. Шендеров // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 1. – С. 3–25.
48. Определение антагонистической активности лактобацилл Солко (*Lactobacillus acidophilus* Ldt 11/83) при использовании гнотобиологической технологии / С. Попова-Барзашка, В. М. Коршунов, Н. П. Тарабрина, Б. Боссарт // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1990. – № 9. – С. 3–6.
49. Опыт экспериментального и доклинического изучения аутопробиотиков / В. И. Симаненко, В. Н. Донец, А. Н. Суворов // Материалы Всероссийской конференции гастроэнтерологов Юго-Западного региона. – Ростов н/Д, 2009. – С. 83–87.
50. Парфенов, А. И. Дисбактериоз кишечника: новые подходы к диагностике и лечению / А. И. Парфенов, Г. А. Осипов, П. О. Богомолов // Consilium Medicum. – 2001. – Т. 3, № 6. – С. 270–272.

51. Пат. 2139070 РФ. МПК61. А61К35/74 С12N1/20. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобацилл. / Шендеров Б. А., Манвелова М. А. ; патентообладатель Шендеров Борис Аркадьевич ; заявл. 31.03.1999 ; опубл. 10.10.1999.

52. Пат. 2505304 РФ. МПК51 А61К 35/74, А23С 9/127. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые лактобациллы и бифидобактерии / Кузнецов О. Ю., Кузнецова Л. А., Кузнецов А. О., Борисова Е. М., Сафонова М. А.; патентообладатель Кузнецов Олег Ювенальевич ; заявл. 22.06.2010 ; опубл. 27.01.2014. Бюл. № 3. – 7 с.

53. Перунова, Н. Б. Биорегуляция микросимбионтов в микробиоценозе кишечника человека : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.02.03/ Перунова Наталья Борисовна. – Оренбург, 2011. – 41 с.

54. Печуркин, Н. С. Популяционная микробиология / Н. С. Печуркин. – Новосибирск : Наука, 1978. – 277 с.

55. Пешков, М. А. Цитология бактерий / М. А. Пешков. – М. : Изд-во АН СССР, 1955. – С. 220.

56. Поспелова, В. В. Эубиотики – эффективное средство нормализации микробиоты и вклад МИНИИЖ в их разработку (к 100-летию) / В. В. Поспелова, Н. М. Грачева, Г. И. Ханина // Врач. – 1997. – № 4. – С. 30–32.

57. Пребиотики и пробиотики при нарушениях кишечного микробиоценоза у детей / Н. А. Коровина, И. Н. Захарова, В. Н. Костадинова, В. Н. Четманова. – М. : Медпрактика-М, 2004. – С. 72.

58. Пробиотики в комплексном лечении больных с заболеваниями ЖКТ с сопутствующим дисбактериозом кишечника / Н. М. Грачева, О. С. Партин, О. С. Аваков // Лечащий врач. – 2008. – № 9. – С. 78–79.

59. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника : Отраслевой стандарт» (ОСТ 91500.11.0004-2003) : приказ Министерства здравоохранения РФ № 231 от 09.06.2003. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200119089>.

60. Роль внутриклеточных NO и АФК в ответе лактобацилл на сигнальные молекулы бактерий – гомосеринлактон и гексилрезорцин / А. Б. Маргулис, Д. Р. Яруллина, А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская // Учен. зап. Казан. ун-та. Серия Естественные науки. – 2010. – Т. 152, кн. 2. – С. 137–144.

61. Роль пробиотических микроорганизмов в современных технологиях профилактической и восстановительной медицины и возможности повышения эффективности препаратов на их основе / А. М. Амерханова, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, О. Г. Жиленкова, С. А. Лисунова, Е. С. Зубкова, А. А. Кураленко // Новые лекарственные средства. – М., 2007. – Вып. 4. – С. 4–7.

62. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной. – М. : Бином, 2008. – С. 278.

63. Румянцев, А. Г. Дисбактериоз как индикатор здоровья и показание к терапии у детей: национальный миф и научная реальность / А. Г. Румянцев // Детская больница. – 2000. – № 1. – С. 75–77.

64. Руш, К. Микробиологическая терапия / К. Руш, Ф. Руш. – М. : Арнебия, 2003.

65. Синбиотики и их роль в современных технологиях профилактической и восстановительной медицины / А. В. Алешкин, А. М. Амерханова, О. Г. Жиленкова, С. С. Лисунова, Е. С. Зубкова, А. А. Кураленко // Клиническое питание. – 2007. – № 1–2. – С. 19.

66. Смирнов, К. К. Лаг-фаза – фаза опережающего отражения развития бактериальной культуры / К. К. Смирнов, С. Г. Смирнов, З. Г. Смирнова // Физико-химические исследования патогенных энтеробактерий в процессе культивирования: сб. науч. статей. – Иваново, 1982. – С. 42–53.

67. Суржик, А. В. Влияние пробиотической культуры *Lactobacillus rhamnosus GG* на иммунный ответ организма / А. В. Суржик // Вопр. современной педиатрии. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 54–58.

68. Тец, В. В. Бактериальные сообщества / В. В. Тец // Клеточные сообщества / под ред. В. В. Теца. – СПб. : Изд-во СПбГМУ, 1998. – С. 15–73.
69. Ткаченко, Е. И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е. И. Ткаченко, Ю. П. Успенский. – СПб. : Спецлит, 2006. – С. 590.
70. Точилина, А. Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus* : автор. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04, 03.00.07 / Точилина Анна Георгиевна. – Н. Новгород, 2009. – 25 с.
71. Успенский, Ю. П. Коррекция нарушений кишечного микробиоценоза пробиотиком на основе природного адсорбента : метод. рекомендации / Ю. П. Успенский, Е. Б. Валуева, Л. С. Орешко. – СПб., 2005. – С. 14.
72. Ушкалова, Е. А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии / Е. А. Ушкалова // Фарматека. – 2007. – № 6. – С. 16–23.
73. Феклисова, Л. В. Применение лактозосодержащих пробиотиков: оценка многолетнего использования Аципола в педиатрической практике / Л. В. Феклисова // Педиатрия. – 2007. – № 2 – С. 31–35.
74. Хавкин, А. И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / А. И. Хавкин // РМЖ. – 2003. – Т. 11, № 3. – С. 122–126.
75. Цветкова, Л. Н. Дисбактериоз кишечника у детей и подходы к его коррекции / Л. Н. Цветкова // Consilium Medicum. Детская гастроэнтерология. – 2002. – Прил. – С. 3–10.
76. Червинец, Ю. В. Антагонистическая активность пробиотических штаммов для заквасок прямого внесения / Ю. В. Червинец. – Тверь ; М., 2006. – С. 353–358.
77. Шендеров, Б. А. Гомо- и аутопробиотики в формировании здорового поколения россиян / Б. А. Шендеров // Питание детей – XXI век : матер. 1-го Всерос. конгр. – М., 2001. – С. 97.
78. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б. А. Шендеров. – Т. 3. – М. : Грантъ, 2001. – С. 287.

79. Шендеров, Б. А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья / Б. А. Шендеров // *Метаморфозы*. – 2014. – № 5. – С. 72–80.

80. Шендеров, Б. А. Функциональное питание, криогенные банки микробиоценозов и их роль в сохранении и восстановлении здоровья / Б. А. Шендеров // *Вестн. восстановительной медицины*. – 2003. – № 1. – С. 29–31.

81. A molecular view of the intestinal ecosystem / E. E. Vaghan, F. Schut, H. G. Hcilig [et al.] // *Curr. Issues Intest. Mikrobiol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 1–12.

82. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection / M. Juntunen, P. V. Kirjavainen, A. C. Ouwehand // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2001. – Mar, 8(2). – P. 293–296.

83. Ahrne, S. Intestinal passage of *Lactobacillus rhamnosus* DSM6594 after oral administration in fermented milk / S. Ahrne, M. L. Johansson, G. Molin // *Netherlands Milkand Dairy J.* – 1995. – Vol. 49. – P. 201–206.

84. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics / J. Gobom, M. Schuerenberg, M. Mueller // *Analytical chemistry*. – 2001. – Vol. 73(3). – P. 434–438.

85. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Noiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov // *Int .J. Antimicrob. Agents*. – 2010. – Vol. 35. – P. 322–332.

86. Antimicrobial substance from a human L. Strain / M. Silva, N. V. Jacobus, C. Deneke, S. L. Gorbach // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1987. – Vol. 31. – P. 1231–1233.

87. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions / J. Mannik, R. Driessen, P. Galajda // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, № 35. – P. 14861–14866.

88. Bengmark, S. Colonic food: pre- and probiotics / S. Bengmark // *Am. J. Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 95 (1). – P. 5–7.

89. Chapter 15. Microbiome to Brain: Unravelling the multidirectional axes of communication / S. El Aidy, R. M. Stilling, T. G. Dinan, J. T. Cryan //

Microbial Endocrinology: Interkingdom signaling in infectious disease and health / ed. by M. Lyte // *Advances in Experimental Medicine and Biology* 874, Springer International Publishing AG. – 2016. – P 301–336.

90. Chen, C. C. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states / C. C. Chen, W. A. Walker // *Adv. Pediatr.* – 2005. – Vol. 52. – P. 77–113.

91. Collins, M. D. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut / M. D. Collins, G. R. Gibson // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – Vol. 69, № 5. – P. 1052–1057.

92. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial / E. Guillemard, F. Tondu, F. Lacoïn, J. Schrezenmeir // *Br. J. Nutr.* – 2010. – Vol. 103(1). – P. 58–68.

93. Contardi, I. Bacterioterapia orale quale prevenzione della diarrea da antibiotici in eta pediatrica / I. Contardi // *Clin. Ter.* – 1991. – Vol. 136, № 6. – P. 409–413.

94. Corthesy, B. Cross-Talk between probiotic bacteria and the host immune system / B. Corthesy, H. R. Gaskins, A. Marcenier // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137. – P. 781–790.

95. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications / F. Bäckhed, C. M. Fraser, Y. Ringel // *Cell Host Microbe.* – 2012. – Vol. 12(5). – P. 611–622.

96. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice / M. L. Cross, R. R. Mortensen, J. Kudsk, H. S. Gill // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2002. – Vol. 191, № 1. – P. 49–53.

97. Dudler, R. Interactions between bacteria and eukaryotes via small molecules / R. Dudler, L. Ebert // *Curr Opin Biotechnol.* – 2006. – Vol. 17. – P. 268–273.

98. Effect of wheybased culture supernatant of *L. acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans // P. Michetti, G. Dorta, P. H. Wiesel // *Digestion*. – 1999. – Vol. 60 (3). – P. 203–209.
99. Empirical antimicrobial therapy for traveler's diarrhoea / J. A. Adachi, L. Ostrosky-Zeichner, H. L. Du Ront, C. D. Ericsson // *Clin. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 31. – P. 304–314.
100. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections / N. Noiby, T. Bjarnsholt, C. Moser [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2015. – Vol. 21, № 1. – P. 1–25.
101. Eutamene, H. Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress / H. Eutamene, L. Bueno // *An. Int. J. of Gastroenterology and Hepatology*. – 2007. – Vol. 56, № 11. – P. 1495–1497.
102. Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? / R. M. Stilling, S. R. Bordenstein, T. G. Dinan, J. F. Cryan // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2014 – Vol. 4. – P. 147
103. Functional food science and gastrointestinal physiology and function / S. Salminen, C. Bouley, M. C. Boutron-Rault // *British. I. Nutrition*. – 1998. – Vol. 80, Suppl. 1. – P. 147–171.
104. Gut microbiota in health and disease / I Sekirov., S. L. Russell, L. C. Antunes, B. B. Finlay // *Physiol. Rev.* – 2010. – Vol. 90(3). – P. 859–904.
105. Hancock, V. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infections *Escherichia coli* strains / V. Hancock, L. Ferrieres, P. Klemm // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 51. – P. 212–219.
106. Hatakka, K. Probiotics in intestinal and non-intestinal infectious diseases – clinical evidence / K. Hatakka, M. Saxselin // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – № 14. – P. 1351–1367.
107. *Helicobacter pylori* treatment: a role for probiotics / F. Cremonini, F. Canducci, S. Di Caro // *Digest Dis.* – 2001. – Vol. 19. – P. 144–147.
108. History, present situation, and prospects of probiotic research conducted in the G. N. Gabrichevsky Institute for Epidemiology and Microbiology

/ V. A. Aleshkin, A. M. Amerhanova, V. V. Pospelova [et al.] // Microbial Ecology in Yealth and Disease. – 2008. – Vol. 20. – P. 113–115.

109. Hochman, J. A. The role of small bowel bacterial overgrowth in infantile colic / J. A. Hochman, C. Simms // J. Pediatr. – 2005. – Vol. 147(3). – P. 410–411.

110. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults a high throughput microarray analysis / T. Ringel-Kulka, J. Cheng, Y. Ringel // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (5). – P. 64315.

111. Kleerebezem, M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis / M. Kleerebezem // Peptides. – 2004. – Vol. 25(9). – P. 1405–1414.

112. *Lactobacillus casei* Is Able to Survive and Initiate Protein Synthesis during Its Transit in the Digestive Tract of Human Flora-Associated Mice / R. N. Oozeer, N. Goupil-Feuillerat, C. A. Alpert // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68, № 7. – P. 3570–3574.

113. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acuete diarrhoea: a multicenter European trial / S. Guandalini, L. Pensabene, M. Zikri // J. Pediatr. Gastroenteroi Nutr. – 2000. – Vol. 30. – P. 54–60.

114. *Lactobacillus GG* in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections / I. Hojsak, S. Abdović, H. Szajewska // Pediatrics. – 2010. – Vol. 125(5). – P. 1171–1177.

115. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) Versus Simethicone in the Treatment of Infantile Colic: A Prospective Randomized Study / F. Savino, E. Pelle, E. Palumeri // Pediatrics. – 2007 – Vol. 119. – P. 124–130.

116. *Lactobacillus therapy* for acute infectious diarrhoea in children: a meta-analysis / C. W. Van Nil, C. Feudtner, M. M. Garrison, D. A. Christakis // Pediatrics. – 2002. – Vol. 109. – P. 678–684.

117. Lebeer, S. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action / S. Lebeer, J. Vanderleyden, S. C. De Keersmaeker // J. Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2008. – Vol. 72(4). – P. 728–764.
118. Lin, D. C. Probiotics As Functional Foods / D. C. Lin // BMJ. – 2001. – Vol. 322. – P. 1327.
119. Marteau, P. Tolerance of probiotics and prebiotics / P. Marteau, P. Seksik // J. Clin. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 38. – P. 67–69.
120. Mitsuoka, T. Ekology of the Bifidobakteria / T. Mitsuoka, C. Kanenchi // Amer. J. Clin. Nuth. – 1977. – Vol. 30. – P. 1799–1810.
121. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine / L. Hooper, M. Wong, A. Thelin // Science. – 2001. – Vol. 291. – P. 881–884.
122. Naidu, A. S. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) / A. S. Naidu, W. R. Bidlack, R. A. Clemens // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 1999. – Vol. 38. – P. 13–126.
123. O’Toole, G. A. Biofilm formation as microbial development / G. A. O’Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // Ann. Rev. Microbiol. – 2000. – Vol. 54. – P. 49–79.
124. Olson, M. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M. Olson, D. Morck // Can. J. Vet. Res. – 2002. – April. – Vol. 66(2). – P. 86–92.
125. Preterm neonates updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis / G. Deshpande, Sh. Rao, S. Patole, M. Bulsara // Pediatrics. – 2010. – Vol. 125 (5). – P. 921–930.
126. Probiotic activities of *L. casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties / C. Forestier, C. De Champs, C. Vatoux, B. Jolu // Microbiol. – 2001. – Vol. 152. – P. 167–173.
127. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract / I. Lenoir-Wijnkoop, M. E. Sanders, M. D. Cabana, D. Merenstein, B. Pot // Nutr. Rev. – 2007. – Vol. 65. – P. 469–489.

128. Probiotic Cheese / C. Stanton, G. Gardiner, P. B. Lynch // *Int. Dairy J.* – 1998. – Vol. 8. – P. 491–496.

129. Probiotics: How should they be defined? / S. Salminen, A. G. Ouwehand, Y. Benno, Y. K. Lee // *Trends in Food Science and Technology.* – 1999. – Vol. 10. – P. 107–110.

130. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms / J. M. Hamilton-Miller, S. Shah, J. T. Winkler // *Public Health and Nutrition.* – 1999. – Vol. 2 (Suppl.). – P. 223–229.

131. Rajilic-Stojanovic, M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota / M. Rajilic-Stojanovic, W. M. de Vos // *FEMS Microbiol Rev.* – 2014. – Vol. 38(5). – P. 996–1047.

132. Responses of Micropopulation in Black Soil of Northeast China to Long-Term Fertilization and Crops / Jian-li Ding, Xin Jlang, Da-wei Guan [et al.] // *Scientia Agricultura Sinica.* – 2016. – Vol. 49, Issue 22. – P. 4408–4418.

133. Rolfe, R. D. The role of probiotikc cultures in the control of gastrointestinal health / R. D. Rolfe // *J. Nutrition.* – 2000. – Vol. 130. – P. 396–402.

134. Ryder, M. A. Catheter-Related Infections: Its All About Biofilm / M. A. Ryder // *Topics in Advanced Practice Nursing J.* – 2005. – Vol. 5 (3).

135. Salminen, S. Laktic Acid Bakteria. Their influence on Intestinal Microflora and Clinical Aplikation / S. Salminen // *10th Intern. Symp. Lactic Acid Bacteria and Human Healht 1997.* – Seul : Publ. R&D Center, Korea Yakult Co., Ltd, 1998. – P. 443–450.

136. Sanders, M. E. Food Formats for effective delivery of probiotics / M. E. Sanders, M. L. Marco // *Ann. Rev. Food. Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 1. – P. 65–85.

137. Saxena, S. M. Effect of casitone and fructose on the growth of *L. acidophilus* storage / S. M. Saxena, B. K. Mital, S. K. Garg // *Intern. J. Food. Microbiol.* – 1994. – Vol. 21, № 3. – P. 271–276.

138. Sharma, A. Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis / A. Sharma, D. Rudra // *Front. Immunol.* – 2018. – 9:883. doi: 10.3389/fimmu. 00883.
139. Sekirov, I. Role of the gut micro-biota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ / I. Sekirov, S. L. Russell // *Therap. Adv. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 6(4). – P. 295–308.
140. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis / S. M. O'Mahony, G. Clarke, Y. E. Borre [et al.] // *Behavioural Brain Research* – 2014 – Vol. 277, № 2. – P. 138.
141. Shenderov, B. A. Functional and Personal Foods: Current condition and perspectives / B. A. Shenderov // *Sankt-Petersburg Gastroenterol.* – 2010. – № 2–3. – P. 2–4.
142. Stark, P. L. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life / P. L. Stark, A. Lee // *J. Med. Microbiol.* – 1982. – Vol. 15 (2). – P. 189–203.
143. Suppressive effect of *L. casei* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans / I. Sakamoto, M. Igarahi, K. Kimura // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2001. – Vol. 47. – P. 7099–70100.
144. Szajewska, H. Probiotics in the treatment and prevention of acute infection darrhoea in infants and children: a systematic review of published randomized, double – blind, placebo-controlled trials / H. Szajewska, J. Z. Mrukowicz // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2001. – Vol. 33 (Suppl 2). – P. 17–25.
145. Tannock, G. W. Analysis of the intectinal microflora: A renaissance / G. W. Tannock // *Antonie van Heenwenhoek.* – 1999. – Vol. 76. – P. 265–278.
146. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections / W. Costerton, R. Veeh, M. Shirtliff // *Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112. – P. 1466–1477.

147. The gut microbiota and lipid metabolism: implications for human health and coronary heart disease / F. Fava, J. A. Lovegrove, R. Gitau // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 13(25). – P. 3005–30021.

148. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing / L. Dethlefsen, S. Huse, M. L. Sogin, D. A. Relman // *PLoS Biol.* – 2008. – № 6 (11). – P. 280.

149. Tiwary, C. M. Effect of pectin on satiety in healthy US Army adults / C. M. Tiwary, J. A. Ward, B. A. Jackson // *J. Am. Coll. Nutr.* – 1997. – Vol. 16. – P. 423–428.

150. Tuomola, E. M. The effect of probiotic bacteria on adhesion of pathogens to human intestinal mucus / E. M. Tuomola, A. C. Owehand, S. J. Salminen // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1999. – Vol. 26. – P. 137–142.

151. Van der Vaaij, D. Evidence of immunoregulation of the composition of intestinal microflora and its practical consequences / D. Van der Vaaij // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1988. – Vol. 7. – P. 103–106.

152. Walker, R. Probiotic microbes: the scientific basis / R. Walker, M. Buckley // *A report from the American Academy of Microbiology*, 2006.

153. Watnick, P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // *J. Bacteriol.* – 2000 – Vol. 182. – P. 2675–2679.

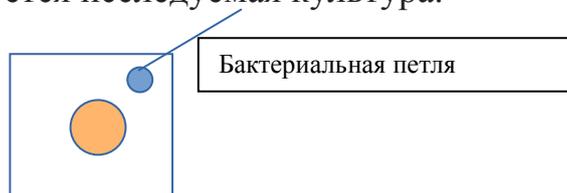
154. Williams, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world / P. Williams // *Microbiology.* – 2007. – Vol. 153. – P. 3923–3938

155. Wong, G. C. L. All together now: Integrating biofilm research across disciplines / G. C. L. Wong, G. A. O'Toole // *MRS Bulletin.* – 2011. – Vol. 36. – P. 339–342.

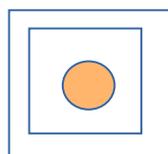
156. Yost, C. K. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage / C. K. Yost, F. M. Nattress // *Lett Appl. Microbiol.* – 2000. – Vol. 31. – P. 129–133.

Схема сборки стационарной камеры диффузного типа для культивирования микроорганизмов (СКДТ).

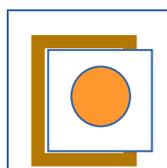
1 этап: на тонкий слой «голодного» агара, находящегося на покровном стерильном стекле инокулируется исследуемая культура.



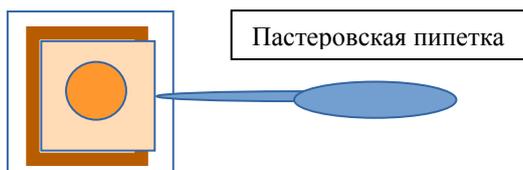
2 этап: после испарения с поверхности агара избыточной влаги поверхность накрывается вторым покровным стеклом меньшего размера



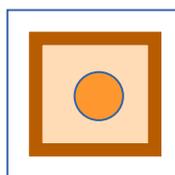
3 этап: камера с трех сторон окантовывается герметизирующей замазкой



4 этап: с помощью стерильной пастеровской пипетки в капиллярную щель между стеклами к слою агара с клетками подводится жидкий питательный бульон



5 этап: герметизирующей замазкой закрывается четвертая сторона микрокамеры, и камера готова к работе



Приложение 2

Коэффициент пропускания развивающейся культуры лактобацилл при добавлении слюны генетически близких родственников

Условия постановки эксперимента		Actimel <i>L.casei</i>	Иммунеле <i>L.casei</i> , <i>L.rhamnosus</i>		Белая киска <i>L.casei</i>		Лакто- бактерин <i>L.fermentum</i>			
Генетически близкие родственники (брат/брат, сестра/сестра)	№ п/п	время	Коэффициент пропускания, ед.							
	1 пара	0 ч.	85	87	71	87	61	70	77	82
		1 час	87	86	87	74	62	63	82	85
		2 часа	87	86	80	84	56	71	84	85
		3 часа	83	81	79	78	57	66	83	84
	2 пара	0 ч.	56	73	59	73	81	82	81	82
		1 час	64	75	61	72	82	82	82	82
		2 часа	60	70	59	79	82	82	81	81
		3 часа	61	70	60	67	78	78	79	78
	3 пара	0 ч.	76	74	66	67	78	75	77	73
		1 час	75	73	65	66	77	74	76	72
		2 часа	75	73	62	64	76	72	75	71
		3 часа	73	71	59	61	75	71	75	71
	4 пара	0 ч.	16	17	12	19	8	11	31	20
		1 час	17	17	13	19	8	13	30	19
		2 часа	17	17	12	17	8	10	24	17
		3 часа	13	14	10	15	6	9	19	14
	5 пара	0 ч.	26	21	36	28	8	7	15	7
		1 час	25	21	35	29	9	8	19	7
		2 часа	22	18	31	25	8	8	17	5
3 часа		16	13	22	18	7	6	13	4	

Коэффициент пропускания развивающихся культур лактобацилл при добавлении слюны генетически чужих людей

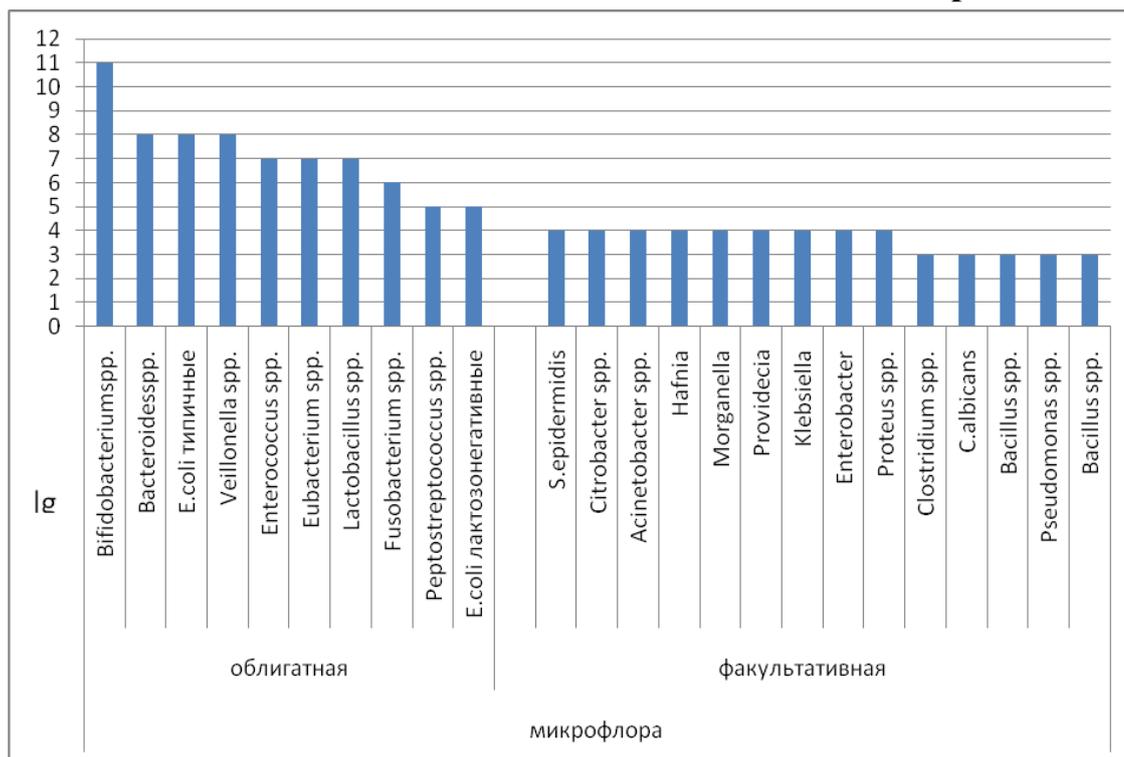
Условия постановки эксперимента		Actimel <i>L.casei</i>	Иммунеле <i>L.casei</i> , <i>L.rhamnosus</i>	Белая киска <i>L.casei</i>	Лакто- бактерин <i>L.fermentum</i>					
Генетически близкие родственники (брат/брат, сестра/сестра)	№ п/п	время	Коэффициент пропускания, ед.							
		0 ч.	65	74	65	67	67	72	68	78
	1 пара	1 час	64	72	65	66	67	72	68	77
		2 часа	66	74	66	67	67	72	69	77
		3 часа	64	72	64	66	65	69	66	75
		0 ч.	26	74	36	67	8	72	15	78
	2 пара	1 час	25	72	35	66	9	72	16	77
		2 часа	22	74	31	67	8	72	17	77
		3 часа	16	72	22	66	7	69	13	75
		0 ч.	26	85	36	71	8	61	15	77
	3 пара	1 час	25	87	35	87	9	62	16	82
		2 часа	22	87	31	80	8	56	17	84
		3 часа	16	83	22	79	7	57	13	83
		0 ч.	85	73	71	73	61	82	77	82
	4 пара	1 час	87	72	87	72	62	82	82	82
		2 часа	87	79	80	79	56	82	84	81
		3 часа	83	67	79	67	57	78	83	78
		0 ч.	87	73	87	73	70	82	82	82
	5 пара	1 час	86	75	74	72	63	82	85	82
		2 часа	86	70	87	79	71	82	85	81
3 часа		81	70	78	67	66	78	84	78	

Приложение 3

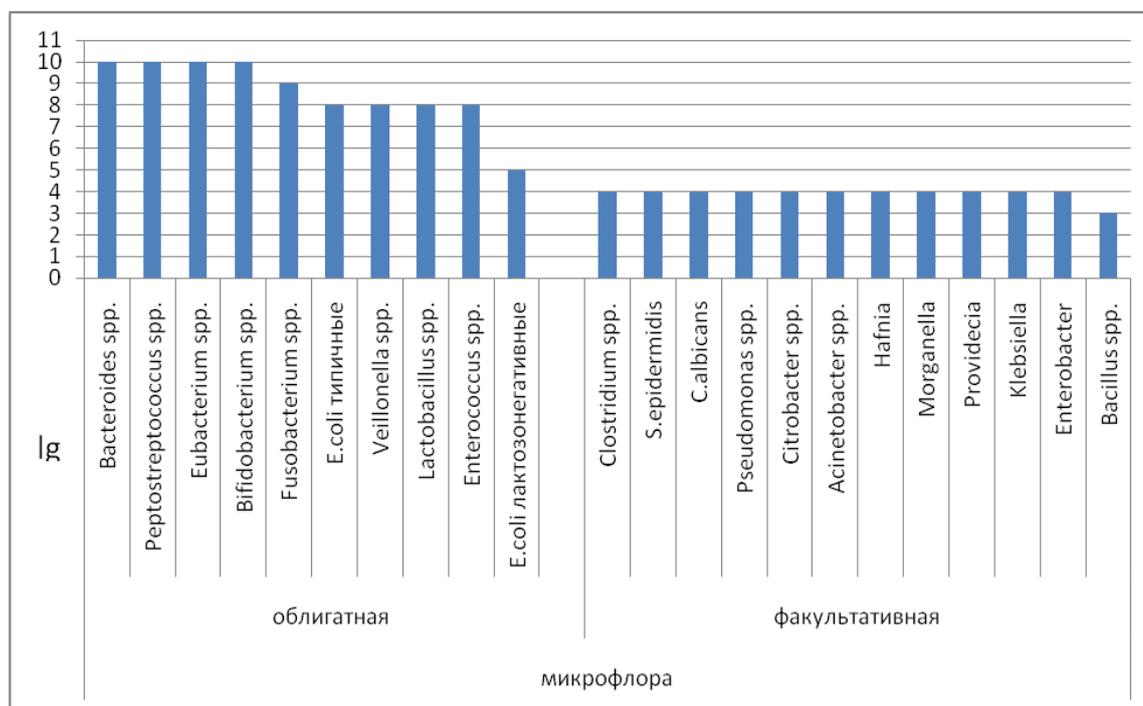
Микробный пейзаж последовательных серийных разведений микробиоценоза кишечника

Виды микроорганизмов		Возраст (годы)		
		<1	1-60	>60
Облигатная микробиота	Бифидобактерии (<i>Bifidobacterium spp.</i>)	$10^{10}-10^{11}$	10^9-10^{10}	10^8-10^9
	Лактобактерии (<i>Lactobacillus spp.</i>)	10^6-10^7	10^7-10^8	10^6-10^7
	Бактероиды (<i>Bacteroides spp.</i>)	10^7-10^8	10^9-10^{10}	$10^{10}-10^{11}$
	Энтерококки (<i>Enterococcus spp.</i>)	10^5-10^7	10^5-10^8	10^6-10^7
	Пептострептококки (<i>Peptostreptococcus spp.</i>)	$<10^5$	10^9-10^{10}	10^{10}
	Эубактерии (<i>Eubacterium spp.</i>)	10^6-10^7	10^9-10^{10}	10^9-10^{10}
	Типичные кишечные палочки (<i>E.coli</i>)	10^7-10^8	10^7-10^8	10^7-10^8
	Кишечные палочки лактозонегативные (<i>E.coli</i>)	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
	Вейлонеллы (<i>Veillonella spp.</i>)	$<10^8$	$<10^8$	$<10^8$
	Фузобактерии (<i>Fusobacterium spp.</i>)	$<10^6$	10^8-10^9	10^8-10^9
Факультативная микробиота	Клостридии (<i>Clostridium spp.</i>)	$\leq 10^3$	$\leq 10^5$	$\leq 10^5$
	Дрожжеподобные грибы р. Кандида (<i>C.albicans</i>)	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	Бациллы (<i>Bacillus spp.</i>)	10^3	10^3	10^3
	Стафилококк (<i>S.epidermidis</i>)	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	Псевдомонады (<i>Pseudomonas spp.</i>)	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	Цитробактерии (<i>Citrodacter spp.</i>)	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	Акинетобактерии (<i>Acinetobakter spp.</i>)	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	<i>Hafnia</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	<i>Morganella</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	<i>Providencia</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	<i>Klebsiella</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	<i>Enterobacter</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
	Протеи (<i>Proteus spp.</i>)	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$

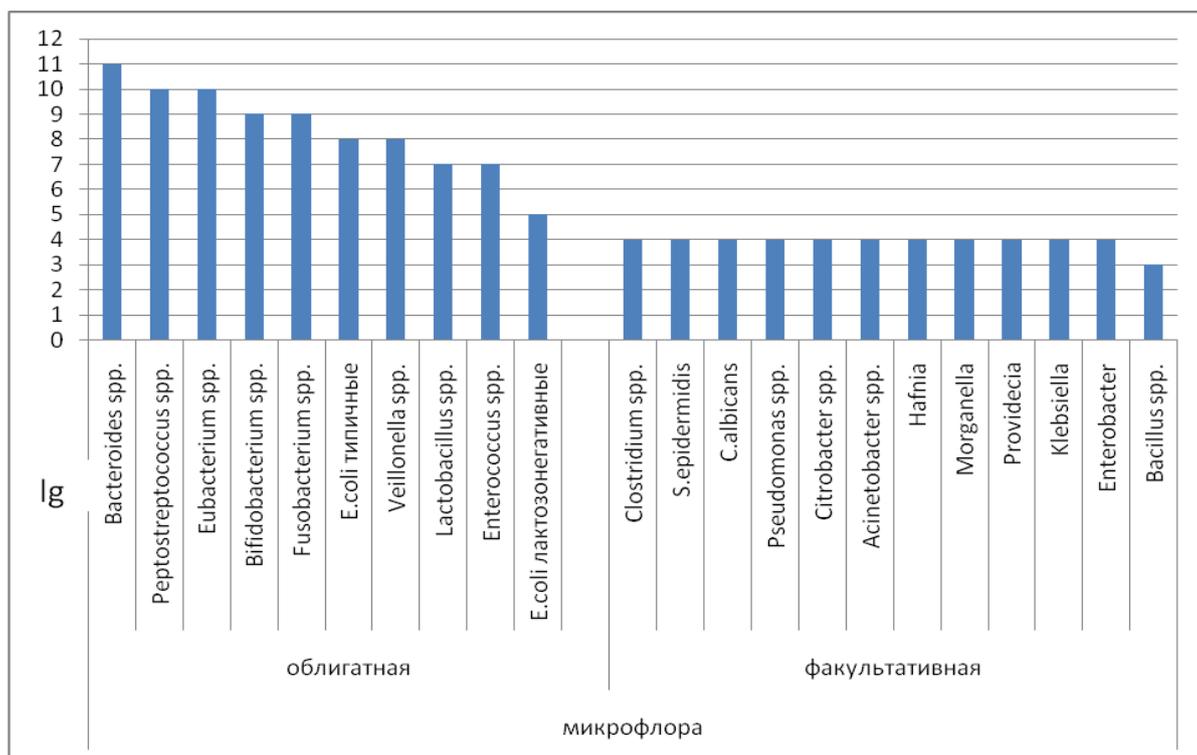
Представленные выше данные регистрируемых значений микробного пейзажа микрофлоры кишечника в определенных серийных разведениях по данным литературных источников (Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004–2003, Приказ Министерства здравоохранения РФ № 231 от 09.06.2003)) позволяют определить критические разведения для определенных представителей микробиоты облигатных и факультативных представителей в зависимости от возраста человека. Более детальное и наглядное представление качественного и количественного состава микробиоты в определенном возрасте показано в приложении 4.



Качественный и количественный (lg n) состав микробиоты кишечника детей в возрасте до 1 года



Качественный и количественный (lg n) состав микробиоты кишечника человека в возрасте от 1 года до 60 лет



Качественный и количественный (lg n) состав микробиоты кишечника человека в возрасте старше 60 лет

Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы

Этап 1. Пробоподготовка.

Для получения аутопробиотика необходимо отобрать у одного и того же организма фекалии и слюну. Особенности отбора проб описаны ниже.

Взятие материала для последующего выделения аутокультур микроорганизмов из содержимого толстой кишки выполняют от последнего приема пищи не менее 8 часов. Накануне исследования необходимо соблюдать диету без употребления в составе пищи раздражающих компонентов (перец, горчица, алкоголь и т.п.), а также других способных повлиять на качественный и количественный состав микробиоценоза кишечника. Проба фекалий отбирается в стерильный контейнер, который до и после отбора взвешивается. Это необходимо знать для последующих расчетов по количественной оценке концентраций микроорганизмов.

Слюну забирают утром, через час после еды. Перед забором слюны ротовую полость ополаскивают дистиллированной водой или теплым бледно-розовым раствором перманганата калия, затем через 5 - 10 минут начинают отбор слюны в чистую пробирку или флакон в объеме 1,0 - 5,0 мл. Впоследствии весь объем полученной слюны переносят в пробирку с физиологическим раствором в соотношении 1:1 до общего объема до 5 мл, центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин.

После центрифугирования аккуратно, стараясь не взмутить осадок, надосадочную часть отбирают в чистую емкость. Затем выполняют ультрафильтрацию полученного раствора слюны через мелкопористые фильтры с диаметром пор не более 0,22 мкм для получения стерильного раствора слюны.

Этап 2. Деконтаминация биоматериала от транзиторной микрофлоры.

Первоначально делают последовательную десятикратную разлитровку исследуемого образца отобранного биоматериала любой жидкой питательной средой, пригодной для выделения и культивирования бифидобактерий и лактобацилл, например МРС или БС-средой, с добавлением селективных агентов.

Готовят два ряда таких разведений с соблюдением правил асептики. Первый ряд состоит из пробирок до разведения 10^{-9} и он предназначен для оценки общего количественного содержания бифидобактерий и лактобацилл в исходном биоматериале. Второй ряд состоит из пробирок с биоматериалом до разведения 10^{-6} и он предназначен для получения аутопробиотика.

Причины конечного выбора данного титра (10^{-6}) определяются следующим. Установлено, что иммуноглобулины (и, прежде всего IgA) препятствуют адгезии к стенкам кишечника и тем самым способствуют выведению чужеродных микроорганизмов во внешнюю среду. Подтверждением роли IgA в предотвращении колонизации слизистых посторонними микроорганизмами является тот факт, что 99% бактерий - представителей индигенной анаэробной флоры не покрыты секреторными иммуноглобулинами.

В то же время обнаружен феномен иммунологической толерантности к индигенной микробиоте (Van der vaaij D., 1988), когда энтеробактерии, энтерококки и другие аэробные бактерии кишечника полностью покрыты IgA. Обнаружено, что слизистые желудочно-кишечного тракта начинают реагировать на вводимые микроорганизмы синтезом IgA только тогда, когда количество микроорганизмов составляет 10^6 и более клеток на грамм содержимого тонкой кишки (Lorenz A., 1966).

Учитывая этот факт можно считать, что микроорганизмы в концентрациях менее 10^6 КОЕ/мл являются малозначимыми для оказания

воздействия на физиологические изменения в организме данного живого организма.

Использование слюны исследуемого макроорганизма в процессе пробоподготовки определяется более высокой концентрацией секреторного иммуноглобулина IgA по сравнению с содержанием его в других биологических жидкостях (см. Таблицу — Справочник по иммунотерапии для практического врача под ред. Симбирева А.С., 2002), а также пониженной биологической опасностью при получении и использовании.

Секреторный IgA в биологических жидкостях	Норма мг/мл
Сыворотка крови	1.69 - 5.67
Слюна	115,3 - 299,7
Моча	5,2 - 24,2
Слезная жидкость	58,46 — 93,62
Вагинальный секрет	57,87 — 112,19

Этап 3. Деконтаминации биоматериала от чужеродных микроорганизмов и получение аутопробиотика.

В составе микробиоценоза кишечника возможно существование в большом количестве (превышающем разведения 10^6 КОЕ/г) аллохтонных (транзиторных) микроорганизмов, в том числе и патогенных видов. Для того, чтобы исключить их накопление впоследствии выполняют следующие манипуляции. В пробирку с биоматериалом второго ряда разведения 10^{-6} добавляют стерильный раствор слюны того же индивидуума, подготовленный согласно пробоподготовке по этапу 1 (добавляемый объем 50% объема исследуемого образца). Полученную пробу перемешивают и помещают на инкубацию при 38°C на 48 часов. Затем пробу вынимают из термостата, определяют количество бифидобактерий, лактобацилл и наличия посторонней микрофлоры, делая контрольные высевы. После проверки при отсутствии посторонней микрофлоры проводят пересев материала (1:10) в жидкую питательную среду для культивирования бифидобактерий и

лактобацилл без добавления селективных агентов и культивируют при 38°C в течение 48 часов. Полученная биомасса является аутопробиотиком, содержащим комплекс штаммов бифидобактерий и лактобацилл, характерных для данного индивидуального организма. Контроль за микробным представительством штаммов полученного аутопробиотика осуществляют согласно общепринятому методу посева на различные селективные питательные среды Эндо, Плоскирева, МПА и ТГС для определения посторонней микрофлоры - на этих средах рост в аэробных условиях должен отсутствовать. Для оценки количественного содержания бифидобактерий и лактобацилл в полученном аутопробиотике отдельно делают посеvy на среды МРС и бифидум-среду с добавлением соответствующих селективных агентов. Все определения ведут общепринятыми методами.

Таким образом, предложен способ получения аутопробиотика на основе естественного комплексного микробиоценоза бифидобактерий и лактобацилл толстой кишки человека и животных.