

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

Цапиева Анна Николаевна

**Микробиологический и молекулярно-генетический анализ
молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков**

03.02.03 - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Суворов Александр Николаевич

Санкт-Петербург – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы исследования	6
Цель исследования.	8
Задачи исследования.....	8
Научная новизна исследования	8
Теоретическая и практическая значимость исследования	9
Методология и методы исследования	11
Объекты исследования	11
Микробиологические методы исследования.....	13
Молекулярно-генетические методы исследования.....	15
Методы работы с лабораторными животными	18
Исследования влияния аутопробиотиков и пробиотиков на самочувствие пациентов с нарушением микробиоценоза кишечника	19
Методы биоинформатики и статистики.....	21
Личное участие автора в получении результатов	21
Основные положения диссертации, выносимые на защиту:	22
Степень достоверности и апробация результатов исследования	22
ГЛАВА 1. Обзор литературы	23
1.1. Общие сведения о молочнокислых бактериях	23
1.2. Характеристика рода <i>Lactobacillus</i>	25
1.3. Характеристика рода <i>Enterococcus</i>	26
1.4. Современные методы идентификации молочнокислых бактерий	27
1.5. Пробиотики и их применение.....	30
1.6. Пробиотики на основе собственных штаммов микробиоты.....	32
1.7. Биологическая активность пробиотиков на основе молочнокислых бактерий	33
1.7.1. Критерии оценки биологической активности пробиотиков	33
1.7.2. Безопасность пробиотиков	35
1.8. Заключение	38
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	40
ГЛАВА 2. Микробиологические исследования пробиотических свойств выделенных штаммов молчнокислых микроорганизмов	40

2.1. Выделение молочнокислых микроорганизмов из национальных продуктов и пробиотических препаратов.....	40
2.2. Исследование адаптационных свойств исследуемых микроорганизмов	41
2.3. Определение антагонистической активности микроорганизмов по отношению к грамположительным и грамотрицательным патогенным бактериям	42
ГЛАВА 3. Генетическая характеристика исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов.....	49
3.1. Создание ДНК праймеров для ПЦР	49
3.2. Генетическая идентификация молочнокислых микроорганизмов.....	51
3.2.1. 16S рРНК типирование	51
3.2.2. Идентификация молочнокислых микроорганизмов с помощью ПЦР.....	52
3.2.3. Разработка метода идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР	53
3.2. Исследование геномов исследуемых лактобацилл на наличие генов, кодирующих бактериоцины	57
3.3. Генетический анализ плантарицинового локуса <i>L. plantarum</i> 8P-A3	59
3.4. Полногеномное секвенирование <i>L. plantarum</i> 8P-A3	61
ГЛАВА 4. Анализ способности исследуемых микроорганизмов восстанавливать микробный баланс после индуцированного дисбиоза на модели лабораторных животных	62
ГЛАВА 5. Разработка метода и получение аутопробиотика на основе собственных штаммов микробиоты человека	66
5.1. Выделение индигенных штаммов молочнокислых микроорганизмов.....	66
5.2. Идентификация индигенных молочнокислых микроорганизмов	67
5.3. Исследование геномов исследуемых энтерококков на наличие генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности.....	70
5.4. Получение готового продукта аутопробиотика в виде молочнокислой закваски	71
ГЛАВА 6. Исследование влияния пробиотиков и аутопробиотиков на самочувствие пациентов с синдромом раздраженного кишечника	72
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
ВЫВОДЫ.....	86
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	87
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Идея использования чистых культур молочнокислых микроорганизмов в качестве средства для борьбы с преждевременной старостью впервые была высказана Нобелевским лауреатом 1908 года И.И.Мечниковым в его книге «Этюды о природе человека» [24]. «Я воздерживаюсь от всякой сырой пищи и, сверх того, ввожу в свой обиход молочнокислые микробы, мешающие загниванию в кишках» [24]. Именно с этим «загниванием в кишках» ученый связывал преждевременное старение и плохое самочувствие. Ученый обратил внимание на то, что многие жители Болгарии отличаются большей продолжительностью жизни, чем жители других стран. По его мнению, это долголетие обусловлено потреблением кисломолочного напитка «кисело млеко» — болгарской простокваши. Из болгарской простокваши был выделен и испытан на животных бактериальный штамм *Lactobacillus bulgaricus* [25]. «По нашему мнению, лучше всего употреблять кислое молоко, приготовленное при помощи чистых культур молочнокислых бактерий, а также эти культуры в виде мягкой мази, которую можно смешивать с вареньем. Среди молочно-кислых бактерий лучше других болгарская палочка и стрептобациллы» [24]. Столетие спустя идея И.И.Мечникова нашла развитие, и сейчас целое направление в науке посвящено изучению пробиотиков [2, 24].

Термин «пробиотики» в 1989 году ввел Fuller R., предлагая под пробиотиками понимать живые микробные добавки к продуктам и препаратам, которые оказывают полезное воздействие на организм хозяина, улучшая его микробный баланс [82]. Ранее, термин «пробиотик» использовали в 1965 Lilly D.M. и Stillwell R.H., описывая вещества, выделяемые одним микроорганизмом, которые стимулируют рост другого [125].

В 2001 году на объединенной встрече представителей Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН и Всемирной Организации Здравоохранения «пробиотики» были определены как «живые микроорганизмы, которые будучи принятыми в необходимом количестве, способны оказывать положительное воздействие на организм хозяина» [151].

В настоящее время пробиотики выпускают в виде моно- и поликомпонентных препаратов и продуктов, в форме капсул, порошков, жевательных конфет, йогуртов, соков, мазей и суппозиториях. В качестве основы выступают микроорганизмы различных родов — *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Saccharomyces*. Каждый штамм, лежащий в основе пробиотика, отличается свойствами, источником выделения и историей его исследования и использования. Кроме того, существует идея создания

индивидуальных пробиотиков на основе собственных штаммов микробиоты человека – аутопробиотиков [28, 30, 31].

Механизмы действия пробиотиков различны: прямой микробный антагонизм, воздействие на иммунную систему хозяина, поддержание защитной функции эпителия и др. Антагонистическая активность пробиотических микроорганизмов обусловлена тем, что пробиотики конкурируют с патогенными микроорганизмами за питательные вещества и места адгезии на кишечном эпителии [165], продуцируют уксусную [81] и молочную кислоты и другие метаболиты, в том числе бактериоцины, угнетающие рост патогенных микроорганизмов [136]. Пробиотики могут снижать уровень синтеза провоспалительных цитокинов, таких как IFN- γ , TNF- α , IL-8, IL-12 [66], обезвреживают рецепторы токсинов, находящиеся на кишечной стенке и токсины, выделяемые патогенами [57], стимулируют синтез IgA [162].

Пробиотики широко используются для профилактики и лечения диареи различной этиологии [92], в том числе у детей [12], при нарушениях обмена веществ, а также в профилактике рака толстой кишки [60]. Кроме того, пробиотики назначают при различных проявлениях дисбактериоза кишечника, при длительных курсах антибиотико- и химиотерапии, стрессовых состояниях и нарушениях режима питания. Пробиотики используют в гинекологической практике для лечения бактериальных вагинозов, кандидозов [194], в стоматологии для профилактики кариеса и регуляции микробиоценоза ротовой полости [189], в хирургии – для профилактики послеоперационных инфекций [105]. Новорожденным детям, рожденным путем кесарева сечения, а также недоношенным, пробиотики назначаются для формирования нормальной микробиоты кишечника, оптимизации протекания адаптационного периода и улучшения физического состояния [3, 21, 65].

Поиск новых перспективных штаммов-пробиотиков, их характеристика, а также изучение уже известных пробиотических штаммов является важной и актуальной задачей фундаментальной науки. Новые знания о микробиологических и молекулярно-генетических свойствах штаммов молочнокислых бактерий позволит оценить взаимосвязь положительных эффектов, оказываемых такими бактериями на организм человека и животных со свойствами штаммов. Анализ спектра антагонистической активности пробиотических бактерий относительно патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, физиологических свойств штаммов, способности продуцировать антимикробные вещества, оценка влияния штаммов-пробиотиков на макроорганизм и изучение безопасности являются ключевыми факторами при анализе как новых, так и уже известных пробиотических штаммов. Комплексная оценка свойств штаммов молочнокислых бактерий и создание на основе наиболее перспективных штаммов новых отечественных пробиотиков представляется актуальной и целесообразной

задачей, особенно в условиях заполнения российского рынка пробиотическими препаратами и продуктами зарубежного происхождения. Кроме того, идея персонализированной терапии с использованием индивидуальных пробиотиков – аутопробиотиков, на основе собственных штаммов микробиоты человека является актуальным направлением в области создания инновационных отечественных продуктов и препаратов.

Степень разработанности темы исследования

С появлением новейших методов молекулярной генетики и иммунологии изучение как новых, так и давно используемых пробиотических штаммов движется быстрыми темпами. Это связано с осознанием роли микробиоты в поддержании здоровья человека и пониманием, что нарушение микробного баланса может способствовать развитию ряда заболеваний, включая метаболические расстройства и онкологию. Для поддержания и восстановления микробного баланса организма применяют препараты-пробиотики. Первые в России пробиотические препараты были созданы в 1970-х годах Гончаровой В.В. и Тарасовой И.Б. на основе бифидобактерий и лактобацилл соответственно [10, 27, 34]. С появлением информации о свойствах отдельных представителей кишечной микробиоты продолжается разработка препаратов на основе новых пробиотических штаммов. Исследования, направленные на поиск перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов, распространены во всем мире: Германия, Норвегия, Дания [113], Китай и Монголия [205], Тайланд [106], Япония [120], Африка [134]. В нашей стране разработкой новых пробиотических препаратов известны Суворов А.Н. [29], Амерханова А.М. [3], Жиленкова О.Г. [19], Алешкин А.В. [1], Вахитов Т.Я. [9], Бондаренко В.М. [6,7], Ботина С.Г. и Даниленко В.Н. [8].

Многолетнее успешное использование пробиотиков для лечения и профилактики различных состояний, сопровождающихся дисбиотическими расстройствами, привело к накоплению опыта в применении различных пробиотиков и их терапевтических эффектах. Однако часто имеющиеся данные разрознены, исследования влияния пробиотиков на организм *in vivo* проводятся отдельно от изучения свойств самих штаммов *in vitro*. Более того, часто штаммы молочнокислых бактерий, применяемые для создания пробиотиков на протяжении десятков лет, не исследованы или исследованы недостаточно [8]. Наиболее ярким примером в данном случае является штамм *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Данный штамм используется для создания пробиотических препаратов с 1973 года, была показана его эффективность в лечении дисбиотических состояний, диареи различной этиологии, бактериального вагиноза, в комплексной терапии *Helicobacter pylori* - ассоциированных состояний [36, 37, 38]. Однако геном данного штамма ранее не был охарактеризован за исключением доступной в базе данных

GenBank NCBI нуклеотидной последовательности, кодирующей 16S рРНК штамма [8]. Появившийся за десятилетия использования пробиотиков пробел в знаниях между терапевтическими эффектами штаммов и исследованиями этих штаммов *in vitro* необходимо заполнять новыми данными о генетической организации известных пробиотических штаммов, а вновь выделенные штаммы должны подвергаться комплексному анализу.

Одним из источников получения новых перспективных штаммов являются различные ферментированные продукты, являющиеся частью культуры потребления пищи в странах мира. Следуя наблюдению И.И. Мечникова о том, что жители Болгарии, регулярно употребляющие кислое молоко, отличаются большей продолжительностью жизни, чем жители других европейских стран [24], в данной работе были проанализированы молочнокислые продукты, полученные из Армении и Таджикистана. Оба продукта – «Мацони» и «Чакка», получают в домашних условиях путем внесения заквашенного молока в новую порцию свежего молока. Эти продукты никогда не проходили микробиологический контроль качества, стандартизацию, оценку эффективности или безопасности.

Ключевыми факторами при анализе как новых, так и уже известных пробиотических штаммов должны быть данные об их безопасности, генетических характеристиках, спектре антагонистической активности относительно патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, физиологических свойствах, способности продуцировать антимикробные вещества, а также об особенностях их воздействия на иммунную систему и микробиоценоз.

Наиболее мягким воздействием на организм хозяина отличаются аутопробиотики – персональные пробиотики на основе собственных штаммов микробиоты человека. Впервые использовать собственные штаммы для коррекции дисбиоза после приема антибиотиков было предложено Коршуновым В.М. с соавторами в 1987 году [30]. Затем эта идея нашла свое развитие в работах Шендерова Б.А., он с соавторами предложил создание аутопробиотического комплекса на основе разбавленного кишечного содержимого пациентов, обогащенного лакто- и бифидобактериями [28]. Однако оба способа имеют два основных недостатка – неизвестный конечный состав аутопробиотического комплекса, и, в связи с этим, невозможность контроля качества конечного продукта.

Создание как классических пробиотиков, так и аутопробиотиков, должно производиться исключительно на основе всесторонне исследованных штаммов микроорганизмов. На основании вышесказанного, были сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования - характеристика биологических свойств штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из различных источников, в качестве потенциальных пробиотиков.

Задачи исследования

1. Выделить штаммы молочнокислых микроорганизмов из национальных молочнокислых продуктов и толстой кишки человека и определить их видовую принадлежность
2. Проанализировать пробиотические свойства выделенных штаммов и их безопасность в опытах *in vitro* (устойчивость к низким рН и содержанию желчи; антагонистическая активность; наличие генов, кодирующих бактериоцины; отсутствие генов, кодирующих факторы патогенности)
3. Изучить способность изолированных штаммов восстанавливать микробный баланс на фоне экспериментального дисбиоза, вызванного приемом антибиотиков, на модели *in vivo* с использованием лабораторных животных
4. Разработать подходы к использованию собственных штаммов микробиоты человека (родов *Enterococcus* и *Lactobacillus*) для создания аутопробиотиков
5. Исследовать влияние аутопробиотиков и пробиотиков на основе наиболее перспективных штаммов на самочувствие пациентов с нарушением микробиоценоза кишечника

Научная новизна исследования

На основании анализа совокупности полученных знаний по изучению функционального потенциала пробиотических и аутопробиотических штаммов молочнокислых микроорганизмов были разработаны новые подходы для создания индивидуальных пробиотических продуктов на основе молочнокислых микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*, изолированных из кишечника человека, включающие микробиологический и генетический анализ перспективных штаммов (патент РФ на изобретение № 2460778 от 10.09.2012; патент РФ на изобретение № 2546253 от 10.04.2015; патент РФ на изобретение № 2553372 от 10.06.2015).

С помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов проанализирован видовой состав двух национальных молочнокислых продуктов «Чакка» и «Мацони» и выделены новые штаммы лактобацилл, составляющие основу этих продуктов. Проведенные исследования адаптационных показателей исследуемых штаммов продемонстрировали их способность выживать в условиях, встречающихся в ЖКТ человека - при рН 2,5 и содержании желчи в среде 0,3%. Для всех штаммов определен спектр антимикробной активности в отношении панели из сорока штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов,

включая стрептококки, стафилококки, клебсиеллы, псевдомонады, и показано, что наиболее выраженными антимикробными свойствами обладают штаммы *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3.

Показана способность выделенных молочнокислых бактерий восстанавливать микробный баланс ЖКТ крыс после применения антибиотиков, а также отмечено, что антагонистические свойства молочнокислых бактерий в отношении представителей условно-патогенных микроорганизмов носят индивидуальный характер и не коррелируют с их способностью устранять дисбиотические нарушения, вызванные приемом антибиотиков.

Разработан новый метод определения видовой принадлежности лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР с использованием оригинальных видоспецифических ДНК праймеров для идентификации 12 видов лактобацилл, наиболее распространенных в разных отделах ЖКТ человека, который может быть применен для быстрой генетической идентификации лактобацилл, выделенных от людей, животных, из пищевых продуктов и растений.

Впервые в ДНК штамма *L. plantarum* 8P-A3, применяемого в России для создания фармакологических препаратов-пробиотиков с 1973 года, были выявлены гены, кодирующие бактериоцины - плантарицины EF и NC8, и феромон-плантарицин A, и определена структура соответствующего оперона.

Полногеномное секвенирование штамма *L. plantarum* 8P-A3 установило хромосомную локализацию плантарицинового локуса. Штамм не несет других генов, кодирующих бактериоцины, кроме расположенных на плантарициновом локусе. Обнаружение генов, кодирующих антимикробные пептиды в штамме *L. plantarum* 8P-A3, является косвенным объяснением его выраженной антибактериальной активности.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведенный комплексный анализ исследуемых молочнокислых бактерий определяет новый методологический подход изучения пробиотического потенциала и безопасности перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов на основании их микробиологических (устойчивость к низким pH и содержанию желчи; антагонистическая активность) и молекулярно-генетических (наличие генов, кодирующих бактериоцины; отсутствие генов, кодирующих факторы патогенности) свойств.

Разработанная технология получения аутопробиотиков на основе собственных штаммов молочнокислых бактерий, включающая изучение генетических особенностей перспективных штаммов, позволяет в срок от 5 до 14 рабочих дней получить персональный пробиотик для коррекции дисбиоза.

Разработанный метод видовой идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР, который является эффективным и достоверным для определения вида лактобацилл, позволяет идентифицировать штаммы в течение одного рабочего дня и может быть рекомендован для рутинного применения в лабораториях, объектом изучения которых являются лактобациллы.

На основании совокупности полученных данных изучения пробиотического потенциала, индивидуального спектра антимикробной активности, исследований на модели лабораторных животных из исследуемых штаммов молочнокислых бактерий были отобраны наиболее перспективные для практического применения (патент РФ на изобретение № 2391395 от 10.06.2010, патент РФ на изобретение № 2391393 от 10.06.2010). Двухкомпонентная закваска на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 сертифицирована ООО «Авена» для использования в пищевых продуктах.

В базу данных GenBank NCBI задепонированы следующие нуклеотидные последовательности: CP046726 - полногемный сиквенс *L. plantarum* 8P-A3; HQ651181 - плантарициновый локус *L. plantarum* 8P-A3; EU346727 - участок кодирующий 16S рРНК *L. delbrueckii* TS1-06; EU346728 - участок кодирующий 16S рРНК *L. fermentum* TS3-06; GU299484 - участок кодирующий 16S рРНК *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LM1 - GenBank; GU299485 - участок кодирующий 16S рРНК *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Рабочая коллекция микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» пополнена 46 штаммами молочнокислых бактерий: *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2, три штамма *L. fermentum* (ПСРК-7, ПСРК-10, ПСРК-23), четыре штамма *L. delbrueckii* (ПСРК-13, ПСРК-16, ПСРК-17, ПСРК-19), четыре штамма *L. plantarum* (ПСРК-11, ПСРК-25, ПСРК-26, ПСРК-27), два штамма *L. crispatus* (ПСРК-22, ПСРК-32), *L. reuteri* ПСРК-31, два штамма *L. helveticus* (ПСРК-4, ПСРК-8), *L. plantarum* 8P-A3, двадцать пять штаммов *E. faecium* (ПСРК-50, ПСРК-51, ПСРК-53, ПСРК-57, ПСРК-58, ПСРК-60, ПСРК-61, ПСРК-65, ПСРК-66, ПСРК-67, ПСРК-68, ПСРК-69, ПСРК-70, ПСРК-72, ПСРК-73, ПСРК-74, ПСРК-76, ПСРК-77, ПСРК-78, ПСРК-79, ПСРК-80, ПСРК-82, ПСРК-83, ПСРК-84, ПСРК-85).

Разработанный метод создания аутопробиотиков применяется для проведения исследований сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга (акт внедрения от 14.03.2019), а также для выполнения поисковых научных исследований в рамках Государственного задания «Молекулярно-генетические и клеточные основы патогенеза, диагностики и лечения социально значимых заболеваний

инфекционной и неинфекционной природы» (шифр: 0557-2016-0001) (акт внедрения от 15.02.2019).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования является разработка метода комплексного анализа пробиотических свойств перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов. Анализ научной литературы, посвященной методам оценки пробиотических свойств молочнокислых бактерий, а также механизмам пробиотического действия молочнокислых бактерий, проведен на основе формально-логических методов. Для достижения поставленной цели в работе использованы методы микробиологии, биологии, молекулярной генетики и биоинформатики и методы статистической обработки результатов. Работа с лабораторными животными проводилась согласно ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» на основании Протокола №2 Локального этического комитета при Научно-Исследовательском Институте Экспериментальной Медицины Северо-Западного отделения Российской Академии Медицинских Наук от 21 марта 2011 года.

Объекты исследования

В работе использованы свежевыделенные штаммы молочнокислых (Таблица 1, пп. 1- 12) и условно-патогенных микроорганизмов (Таблица 2, столбец 3); штаммы из российских пробиотических препаратов (Таблица 1, пп. 13-14), типовые коллекционные штаммы АТСС (Americal Type Culture Collection) (Таблица 2, столбец 2), коллекционные штаммы отдела молекулярной микробиологии Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Институт экспериментальной медицины» (Таблица 2, столбец 2).

Штаммы молочнокислых микроорганизмов

В исследование вошли шестьдесят два штамма молочнокислых микроорганизмов, изолированных из различных источников в период 2007-2012 гг (Таблица 1), включая штаммы, выделенные от пациентов, страдающих синдромом раздраженного кишечника по направлению из Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга в период 2010 - 2012 гг, а также штаммы, выделенные из национальных молочнокислых продуктов «Чакка» и «Мацони». Продукт «Чакка» является таджикским национальным молочнокислым продуктом, получаемым в домашних условиях путем внесения заквашенного молока в новую порцию свежего молока. Продукт «Мацони» является армянским национальным молочнокислым продуктом. «Мацони»

также получают в домашних условиях путем внесения заквашенного молока в новую порцию свежего молока.

Таблица 1 - Исследуемые культуры молочнокислых микроорганизмов

	Наименование микроорганизма	Источник выделения штамма
1.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> TS1-06	Молочнокислый продукт «Чакка», Таджикистан
2.	<i>Lactobacillus fermentum</i> TS3-06	Молочнокислый продукт «Чакка», Таджикистан
3.	<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i> LM1	Молочнокислый продукт «Мацони», Армения
4.	<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i> LM2	Молочнокислый продукт «Мацони», Армения
5.	<i>Lactobacillus fermentum</i> (3 штамма)	Толстая кишка человека
6.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (4 штамма)	Толстая кишка человека
7.	<i>Lactobacillus plantarum</i> (4 штамма)	Толстая кишка человека
8.	<i>Lactobacillus crispatus</i> (2 штамма)	Толстая кишка человека
9.	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Толстая кишка человека
10.	<i>Lactobacillus helveticus</i> (2 штамма)	Толстая кишка человека
11.	<i>Enterococcus faecium</i> (25 штаммов)	Толстая кишка человека
12.	<i>Enterococcus spp.</i> (15 штаммов)	Толстая кишка человека
13.	<i>Enterococcus faecium</i> L3	«Ламинолакт», ООО Авена, Россия
14.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	«Лактобактерин сухой», ФГУП «НПО «Микроген», Россия

Индикаторные культуры

В качестве индикаторных культур для оценки антагонистических свойств исследуемых культур молочнокислых микроорганизмов использованы 39 штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов из рабочей коллекции отдела молекулярной микробиологии

Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Институт экспериментальной медицины» (Таблица 2).

Таблица 2 - Индикаторные культуры

Индикаторные культуры	Типовые коллекционные штаммы ATCC	Коллекционные штаммы Отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ»
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 700294 (SF370), ATCC BAA-1633 (NZ131)	2, 6, 14, 7281, 4/70, 118, 171, 7761, 152, 128
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	2/86, 1/92, 60/59, 1/82, 090R, 74-430, 75-155, 86, 4272, 6816, 1706
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	42, 60, 76, 209
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	CS35, M15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	1, 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	74, 49
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	SH, 62

Лабораторные животные

Экспериментальные исследования выполнены на самцах крыс линии Wistar массой 200-220 г, возраст 5-7 недель (n=28). Животных получали из питомника «Рапполово» Ленинградской области.

Микробиологические методы исследования

Условия культивирования и хранения

Культивирование лактобацилл проводили на жидкой селективной питательной среде для лактобацилл МРС (Hi-media, Индия; Conda, Испания), агаризованной среде МРС-4/МРС (НИЦФ, Россия; Difco, США), жидкой и агаризованной среде LB (Amresco, США), обезжиренном молоке при 37-40 °С в аэробных и анаэробных условиях в течение 24-48 часов. Энтерококки культивировали на селективной питательной среде Энтерококагар (Оболensk, Россия). Для создания анаэробных условий использовали анаэростат (Schnett-biotech GmbH, Германия) и газогенерирующие пакеты для создания микроаэрофильных/анаэробных условий (ИНКО, Россия).

Хранение микроорганизмов осуществляли в морозильной камере при -70°C (New Brunswick Scientific, США). Для этого чистые культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой питательной среде до стационарной фазы роста, концентрировали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 минут. Отбирали 50-80% надосадочной жидкости и добавляли 10% (по объему) стерильного глицерина. Затем перемешивали на вортексе. Хранение материала осуществляли в течение 6-10 месяцев с проверкой жизнеспособности микроорганизмов каждые 2 месяца. Для более длительного хранения (в течение 2 лет и более) микроорганизмы лиофилизировали. Для этого чистые культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой питательной среде до стационарной фазы роста, разливали по ампулам и высушивали с помощью лиофильной сушки Dura-Dry MP (FTS Systems INC, США). Запаянные ампулы хранили при комнатной температуре.

Исследование устойчивости микроорганизмов к низким рН и желчи

Для определения устойчивости микроорганизмов к низким рН и желчи использовали методику, предложенную К.Дунн с соавторами [70]. Предварительно выращенные до стационарной фазы роста культуры осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 минут, 4°C), затем ресуспендировали в физиологическом растворе с получением конечной концентрации клеток 10^8 КОЕ/мл. Затем повторно осаждали клетки центрифугированием (5000 об/мин, 10 минут, 4°C) и ресуспендировали в питательной среде с рН 1,2; 2,5 и 3,5. Кислотность среды доводили до необходимой 0,1М HCl. Пробы отбирали с момента внесения культуры в среду (0мин), затем через 5, 30 и 60 минут.

Для исследования способности развиваться в присутствии желчи в среде предварительно выращенные до стационарной фазы роста культуры осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут при 4°C . Осадки клеток ресуспендировали в физиологическом растворе с получением конечной концентрации клеток 10^8 КОЕ/мл. Затем в питательную среду MRS, содержащую от 0 до 5% желчи, добавлялся 1% исследуемой культуры. Засеянные среды инкубировали при 37°C в течение 24 и 48 часов. Для определения числа клеток в среде использовали метод посева на плотные питательные среды (метод Коха).

Метод двухслойного агара для определения антагонистической активности микроорганизмов

Для определения антагонистической активности молочнокислых микроорганизмов использовался модифицированный метод двухслойного агара [14, 16]. Молочнокислые микроорганизмы выращивали в питательной среде МРС до стационарной фазы роста (12-18 ч). Затем клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут при 4°C . Клетки ресуспендировали в физиологическом растворе до конечной концентрации клеток 10^9 КОЕ/мл. Затем проводили ряд последовательных разведений культур молочнокислых

микроорганизмов в физиологическом растворе с получением суспензий от 10^9 до 10^2 КОЕ/мл. Далее 1 мл суспензии клеток микроорганизма в различных концентрациях помещали в 9 мл расплавленной, охлажденной до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ агаризованной питательной среды МРС. Суспензию немедленно вносили в чашку Петри, формируя нижний слой агара. После застывания сверху наносили агаризованную среду ТН (для стрептококков) или среду LB (для других индикаторных культур) в количестве 10 мл. Через 24 ч инкубации при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на поверхность агара засеивали по 10 мкл индикаторных культур в количестве 3×10^8 КОЕ/мл. Засеянные среды инкубировали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов.

В качестве индикаторных культур использовали грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы (Таблица 2) из коллекции отдела молекулярной микробиологии Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Институт экспериментальной медицины».

Количественно степень антагонистической активности выражали Минимальной Ингибирующей Концентрацией Антагониста (МИКА). МИКА – это количество антагониста в нижнем слое агара, необходимого для подавления роста индикаторной культуры.

Молекулярно-генетические методы исследования

Методы выделения хромосомной ДНК

Для выделения ДНК использовали чистую культуру микроорганизма в стационарной фазе роста. Клетки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин). ДНК выделяли с использованием следующих методов:

- 1) фенол-хлороформный метод на основе рабочего протокола Отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ»;
- 2) экспресс метод (Маниатис Т., 1984);
- 3) метод с использованием коммерческого набора ДНК-сорб-В (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия)

Метод выделения ДНК фенол-хлороформным методом:

- 1) Вырастили культуру до оптической плотности 0,6 (длина волны 600 нм) в объеме 100 мл;
- 2) Центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин, слили верхний слой, суспензировали в 5 мл ТЕ буфера (рН=8), содержащего 10 мг лизоцима;
- 3) Инкубировали 1 час при 37°C при мягком перемешивании;
- 4) Добавили протеиназу К: 10 мкл в концентрации 20 мг/мл. Инкубировали 15 мин, 65°C при мягком перемешивании;

- 5) Добавили 10% SDS до конечной концентрации 1%. Инкубировали 45 мин – 1,5 часа при 65°C на шейкере;
- 6) Добавили фенол (насыщенный ТЕ буфером) 1:1 по объему. Мягко перемешали;
- 7) Центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин;
- 8) Отобрали верхний слой в чистую пробирку;
- 9) Добавили смесь фенол-хлороформ (1:1) по объему 1:1. Мягко перемешали. Центрифугировали 15 мин при 6000 об/мин. Отобрали верхний слой в чистую пробирку;
- 10) Добавили хлороформ по объему 1:1. Мягко перемешали. Центрифугировали 15 мин, 6000 об/мин. Отобрали верхний слой в чистую пробирку;
- 11) Добавили 96% спирт по объёму спирт-раствор 2:1. ДНК выпала в виде полупрозрачного осадка;
- 12) Центрифугировали 5 мин при 12000 об/мин;
- 13) Добавили 1 мл 70% спирта, перемешали на вортексе;
- 14) Центрифугировали 5 мин при 12000 об/мин (ДНК в виде полупрозрачного осадка на стенке пробирки);
- 15) Высушили ДНК от остатков спирта (0,5-1 час при комнатной температуре);
- 16) Растворили ДНК добавлением 100 мкл ТЕ буфера;
- 17) Хранили ДНК при -20 °С до года.

Экспресс метод выделения ДНК:

- 1) Вырастили культуру до оптической плотности 0,6-0,8 (длина волны 600 нм) в объеме 5 мл;
- 2) Центрифугировали 1 мл суспензии клеток в течение 5 мин при 12000 об/мин, слили надосадок;
- 3) Ресуспензировали в 100 мкл стерильной дистиллированной воды;
- 4) Инкубировали 10 минут при 100°C;
- 5) Центрифугировали 5 мин при 8000 об/мин;
- 6) Использовали ДНК (в надосадке) сразу или хранили до использования при -20 °С.

Метод выделения ДНК с использованием коммерческого набора ДНК-сорб-В:

Выделение хромосомной ДНК с помощью набора проводили согласно прилагаемой инструкции.

Полимеразная цепная реакция

Для постановки ПЦР использовали деионизованную воду и реактивы производства Thermo Scientific (США): Таq-полимеразу, 10х ПЦР буфер с Mg^{2+} , набор дезоксирибонуклеотидов. Для постановки ПЦР использовали амплификатор Терцик (ДНК-технология, Россия).

Температурный профиль ПЦР был подобран по стандартной схеме, включающей общую денатурацию ДНК, отжиг праймеров и элонгацию фрагмента между праймерами. ДНК праймеры, заимствованные из научной литературы приведены в таблице 3, праймеры, сконструированные *de novo*, приведены в разделе 3.1.

Таблица 3 - Праймеры, используемые для детекции генов патогенности энтерококков

Название целевого гена	Нуклеотидная последовательность праймеров		Размер ожид. фрагмента	Ссылка на источник
	прямой	обратный		
<i>E.faecium</i> -спец	ttgaggcagaccagattgacg	tatgacagcgactccgattcc	658	[56]
<i>sprE</i>	gcgtcaatcggaagaatcat	cggggaaaaagctacatcaa	233	[116]
<i>fsrB</i>	tttattggtatcgccacaa	tcatacagaccttgatgacg	316	[116]
<i>asaI</i>	ccagccaactatggcggaaatc	cctgtcgcaagatcgactgta	529	[58]
<i>efaA</i>	cgtagctgcttgcgggaatc	ccatactacgtttatcgacac	735	[58]
<i>gelE</i>	accccgatcattggttt	acgcattgctttccatc	419	[58]
<i>esp</i>	ttgctaagctagtccacgacc	gcgtcaacacttgcatgcccga	932	[58]
<i>vanA</i>	ttcatgttccacgaaccagag	cgttgaacgaacgattgaaaa	436	[20]

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Фрагменты ДНК анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в горизонтальном аппарате (Wide Mini Sub Cell GT, Bio-Rad) с использованием TAE буфера. Для приготовления 1 литра рабочего раствора буфера к 20 мл 50-кратного TAE буфера (10 mM Трис, 0,025% уксусной кислоты, 0,4 mM EDTA) добавляли 980 мл воды. Для приготовления 1% агарозного геля расплавляли 1 г агарозы в 100 мл TAE буфера. В гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мкл. Для нанесения анализируемых проб в гель в них добавляли 1/10 объема буфера для нанесения проб в лунки геля (40% глицерин; 20 mMol EDTA (pH 8,0); 0,25% бромфенола синего) и по 25 мкл вносили в лунки. Время электрофореза составляло 40 минут при силе тока 50 А. Для расчета размеров исследуемых фрагментов ДНК в интервале от 100 п.н. до 1000 п.н. использовали маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100+ п.н. (Thermo Scientific, США). Детекцию результатов электрофореза осуществляли с помощью системы гель-документирования VersaDoc MP4000 с использованием программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, США).

Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с использованием коммерческих наборов "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, США) или «Набор для очистки ДНК» (Омникс, Россия) согласно прилагаемой инструкции.

Секвенирование ДНК методом Сэнгера

Секвенирование исследуемых фрагментов ДНК методом Сэнгера проводили на автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 2000 (Beckman Coulter, США), с использованием набора реактивов GenomeLab DTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter, США). Подготовку проб для секвенирования осуществляли согласно прилагаемому протоколу.

Полногеномное секвенирование бактериальной ДНК

Полногеномное секвенирование бактериальной ДНК было выполнено методом высокопроизводительного секвенирования с использованием комбинации платформ PacBio RS и Illumina HiSeq 4000 на базе научного центра BIOZERON Co., Ltd (Шанхай, Китай).

Определение концентрации ДНК

Для определения концентрации общего пула ДНК измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре «SmartSpec 3000» (BioRad, США) при длине волны 260 нм.

Для определения концентрации двухцепочечных молекул ДНК в образцах измеряли флуоресценцию образцов ДНК после мечения с использованием набора «Quibit Quantitation Starter Kit» (Invitrogen, США). Подготовку образцов для измерения флуоресценции на флуорометре Quibit (Invitrogen, США) проводили согласно прилагаемой инструкции.

Методы работы с лабораторными животными

Для изучения влияния молочнокислых микроорганизмов на макроорганизм и его микрофлору при развитии дисбиотических состояний была использована модель индуцированного дисбиоза кишечника, разработанная д.б.н. Ермоленко Е.И. [17]. Для индукции дисбиоза крысам внутрижелудочно в течение 3 дней вводили ампициллин и метронидазол (15 мг и 10 мг соответственно). Начиная с 4 дня и в течение последующих 5 дней крысам внутрижелудочно вводили молочнокислые закваски на основе исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов (по 10^9 КОЕ). Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

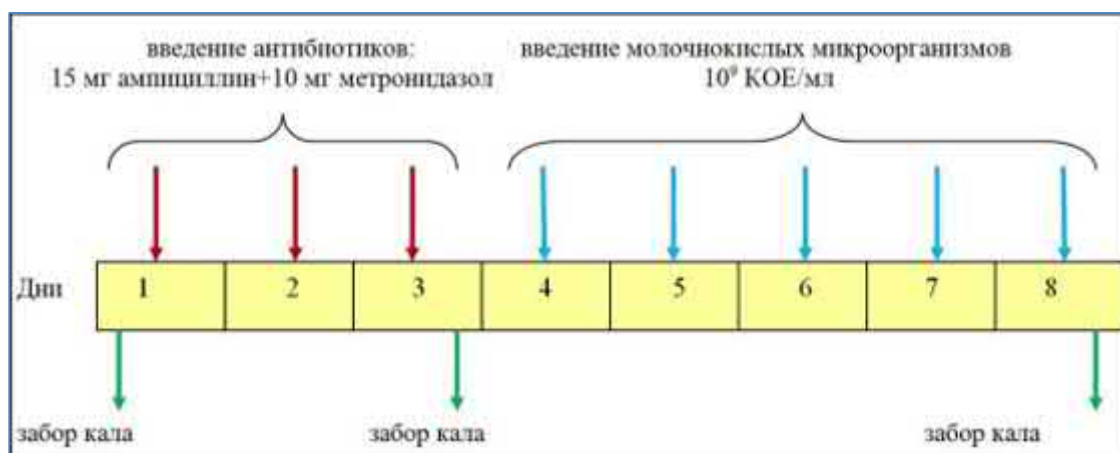


Рисунок 1 - Схема эксперимента по исследованию способности исследуемых микроорганизмов восстанавливать микробный баланс желудочно-кишечного тракта крыс после дисбиоза, вызванного антибиотиками

Согласно приведенному рисунку до и после антибиотикотерапии, а также после применения заквасок были взяты образцы кала животных для исследования изменений состава кишечной микробиоты. В исследование вошли четыре группы животных, три из которых получали молочнокислые закваски на основе пробиотических микроорганизмов, четвертая, контрольная группа животных, после воздействия антибиотиками получала молоко. Каждая группа содержала по 7 животных. Исследуемые группы животных представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Исследуемые группы животных

Группы	Закваска, применяемая для восстановления микрофлоры
Группа <i>L. plantarum</i> 8P-A3	Молоко, заквашенное штаммом <i>L. plantarum</i> 8P-A3
Группа DF-молоко	Молоко, заквашенное двумя штаммами <i>L. delbrueckii</i> TS1-06 и <i>L. fermentum</i> TS3-06
Группа <i>E. faecium</i> L3	Молоко, заквашенное штаммом <i>E. faecium</i> L3
Контрольная группа	Стерильное молоко

Исследования влияния аутопробиотиков и пробиотиков на самочувствие пациентов с нарушением микробиоценоза кишечника

Врачами Городской больницы №26 Санкт-Петербурга Соловьевой О.И. и Сундуковой З.Р. были сформированы группы пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК) для участия в исследовании влияния приема аутопробиотиков и пробиотиков на самочувствие пациентов с нарушением микробиоценоза кишечника. Критерием исключения являлись беременность, наличие инфекционных заболеваний, другой (кроме СРК) гастроэнтерологической патологии. В исследование вошли 84 пациента в возрасте от 22 до 55

лет. От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие. Методом рандомизации все пациенты были разбиты на 4 группы. Все пациенты в течение 10 дней получали один из вариантов пробиотической терапии:

- аутопробиотик на основе собственных штаммов *Lactobacillus spp.* (16 чел.),
- симбиотическую закваску на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 (18 чел.),
- аутопробиотик на основе собственных штаммов *E. faecium* (25 чел.),
- пробиотическую закваску на основе *E. faecium* L3 (25 чел.).

Пациенты получали по 50 мл молочнокислой закваски 2 раза в день в количестве 10^{10} КОЕ/день.

Клиническая оценка влияния пробиотической терапии на состояние пациентов с СРК проводилась на основании динамики выраженности характерных для СРК симптомов. Для этого проводилась полуколичественная оценка клинических симптомов СРК пациентов:

- выраженность боли в животе: 0 – отсутствие боли, 1 – слабые болевые ощущения, 2 – умеренная боль, 3 – сильная боль;
- общее самочувствие: 1 – плохое, 2 – удовлетворительное, 3 – хорошее;
- метеоризм: 0 – отсутствует, 1 – легкий, 2 – умеренный, 3 – выраженный.

Кроме того, оценивалась частота стула (количество дефекаций в сутки) и форма стула по Бристольской шкале. Схема исследования представлена в таблице 5.

Таблица 5 - Схема обследования пациентов с СРК, получавших пробиотическую терапию

Вид исследований	Сроки проведения исследования
Анализ кала на дисбиоз	До применения закваски (не ранее чем за 30 дней) и после окончания применения молочнокислой закваски
Клиническое наблюдение (проводилось в ГБ 26 СПб)	Наблюдения с первого дня использования молочнокислой закваски в течение 10 дней
Клинический анализ крови	Первый и 11-ый день терапии молочнокислой закваской
Биохимический анализ сыворотки крови	Первый и 11-ый день терапии молочнокислой закваской

Для оценки эффективности и выявления наиболее успешного метода проводилась сравнительная микробиологическая и клиническая оценка влияния терапии пробиотическими продуктами на клинические и лабораторные показатели пациентов до и после курса пробиотической терапии.

Методы биоинформатики и статистики

Методы биоинформатики использовали для конструирования ДНК праймеров, анализа нуклеотидных последовательностей после секвенирования, депонирования нуклеотидных последовательностей в базы данных.

Все праймеры были сконструированы и проанализированы с использованием программ Primer-3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), Primer3plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), Primer-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и FastPCR. Праймеры были созданы на основе последовательностей ДНК, имеющих в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Human Microbioma (<http://www.hmpdacc.org/>).

Полученные в результате секвенирования методом Сенгера нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программ Chromas, BioEdit и NCBI BLAST.

Анализ результатов высокопроизводительного секвенирования с последующей сборкой бактериального генома был выполнен с использованием программ FALCON v. 0.3.0 и Celera Assembler v. 8.3. Анализ полногеномного сиквенса выполнен с помощью программ NCBI BLAST и программы автоматической аннотации генома RAST (<https://rast.nmpdr.org/>).

Результаты электрофореза визуализировали и обрабатывали с помощью программы Quantity One (Bio-Rad, США).

Статистический анализ результатов работы был проведен с использованием программы PASW Statistics 18.0 с использованием дисперсионного анализа, критерия Крускала-Уоллиса, критерия Фридмана, критерия Уилкоксона.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора диссертации, заключалось в составлении плана исследования, проведении аналитического обзора литературы, выполнении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, анализе полученных данных, статистической обработке и обобщении полученных результатов. Разработка метода идентификации лактобацилл с помощью мультиплексных ПЦР проводилась самостоятельно автором диссертации. Разработка метода получения аутопробиотиков и работа с лабораторными животными выполнялась совместно с д.м.н. Ермоленко Е.И. Исследование влияния аутопробиотиков, полученных с использованием метода, разработанного автором, на самочувствие пациентов с СРК, проводились сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова к.м.н. Соловьевой О.И. и к.м.н. Сундуковой З.Р. под руководством д.м.н., проф. Симаненкова В.И. на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Разработанный подход по созданию аутопробиотиков с использованием штаммов *Enterococcus faecium* и *Lactobacillus spp.* позволяет получить персональный пробиотик, восстанавливающий микробиоценоз пациента, на основе собственных штаммов микробиоты.

2. Разработан новый метод идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР, который позволяет в течение одного рабочего дня установить видовую принадлежность лактобацилл, выделенных из различных источников.

3. Штаммы *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06; *L. plantarum* 8P-A3; *E. faecium* L3 в виде молочнокислых заквасок способны восстанавливать микробный баланс ЖКТ лабораторных крыс на модели индуцированного дисбиоза кишечника, вызванного антибиотиками.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки исследованных штаммов молочнокислых микроорганизмов, большой объем проведенных исследований. Изучено более 60 штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из толстой кишки человека и других источников. Работа выполнена с применением современных методов микробиологии и молекулярной генетики с использованием сертифицированного и поверенного оборудования.

Основные результаты исследований были представлены на всероссийских и международных конференциях и симпозиумах: на XXXII Международном Конгрессе SOMED, Санкт-Петербург, Россия, 2009; Международной Научной Конференции «Пробиотики и Пребиотики», Кошице, Словакия, 2010, 2011, 2012, 2014, 2017 гг.; Международной Научной Конференции «Микробная Экология Желудочно-Кишечного Тракта», Кошице, Словакия, 2010; конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 2011; 14-ом Международном Славяно-Балтийском научном Форуме, Санкт-Петербург, 2012; Международной конференции «Бактериофаги и пробиотики: альтернатива антибиотикам», Тбилиси, Грузия, 2012; конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург, 2017; Всероссийской мультиконференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего», Санкт-Петербург, 2019.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о молочнокислых бактериях

Группа молочнокислых бактерий объединяет около двадцати родов бактерий и включает микроорганизмы родов *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и некоторые другие [44]. Основной особенностью этой группы является способность к утилизации углеводов по типу молочнокислого брожения с образованием молочной кислоты, как конечного продукта метаболизма [156]. Несмотря на то, что бактерии рода *Bifidobacterium* также потребляют углеводы с образованием молочной кислоты, этот род не входит в группу молочнокислых бактерий, так как филогенетически с этой группой не связан и имеет собственный уникальный путь метаболизма углеводов [175].

Молочнокислые бактерии - грамположительные, по форме кокки или палочки, чаще всего каталазоотрицательные, в большинстве своем неподвижные и не образующие спор [22]. По отношению к кислороду проявляют себя как микроаэрофилы, анаэробы или являются аэротолерантными. По типу метаболизма углеводов эту группу делят на гомоферментативные и гетероферментативные. Группа гомоферментативных молочнокислых бактерий включает некоторые виды *Lactobacillus*, большинство видов *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* и *Vagococcus* и в результате метаболизма углеводов образует в основном молочную кислоту. Группа гетероферментативных молочнокислых бактерий также включает некоторые виды *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* и *Weissella* и в результате метаболизма углеводов образует молочную кислоту, углекислый газ и спирт или ацетат в примерно равных количествах [44].

Молочнокислые бактерии в большинстве своем ограничены в способности использовать в качестве источников питания неорганические вещества, в том числе неорганические источники азота, и часто нуждаются в присутствии различных факторов роста. Многие представители группы молочнокислых бактерий являются крайне требовательными к богатым питательным средам и для нормального роста и развития эти среды должны содержать в готовом виде витамины, аминокислоты, пурины и пиримидины, жирные кислоты. В зависимости от состава питательной среды потребность в факторах роста для молочнокислых бактерий может быть различной. Так, при наличии в среде витамина В₆, может отсутствовать необходимость в присутствии в среде готовых аминокислот, и, наоборот, в случае присутствия в составе среды готовых аминокислот, присутствие в среде витамина В₆ не требуется [22].

Некоторые представители группы молочнокислых бактерий, в основном рода *Streptococcus*, являются патогенными и вызывают такие заболевания как ангина, скарлатина

(*Streptococcus pyogenes*) [76], пневмония, менингит (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*) [35], кариес (*Streptococcus mutans*) [49]. С недавних пор, *Enterococcus faecalis* рассматривается как условно-патогенная флора в связи с участвовавшими случаями внутрибольничных инфекций, вызываемых этим микроорганизмом [153]. Однако, многие представители группы молочнокислых бактерий являются естественными обитателями желудочно-кишечного и урогенитального тракта человека и животных и играют важнейшую роль в поддержании гомеостаза и нормального функционирования последних [2, 126].

Молочнокислые бактерии являются естественными обитателями множества различных субстратов и очень распространены в природе. Кроме того, молочнокислые микроорганизмы входят в состав нормальной микробиоты человека, животных, рыб и насекомых, различные виды бактерий этой группы колонизируют листья, плоды и семена растений. Молочнокислые бактерии выделяют из молока, вина, молочнокислых и других продуктов, получаемых в результате спонтанного брожения. В России и Европе на протяжении веков молочнокислые бактерии используются для получения таких продуктов как сыр, простокваша, кислая капуста, оливки, сыровяленое мясо. Различные ферментированные продукты являются обязательной частью национальной кухни и во многих других странах мира. В качестве сырья, для получения таких продуктов может выступать не только молоко, но и рыба, мясо, злаки, различные овощи.

Для получения ряда африканских алкогольных напитков («Пито», «Бушера»), используют отвар на основе сорго или маиса. В состав таких продуктов чаще всего входят молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Enterococcus* [137]. Разведенные в воде измельченные хлопья из кукурузы, проса, маиса используют для получения продукта «Коко» в Гане. Из «кислой воды Коко» чаще всего выделяют *L. fermentum* и *L. salivarius* [40]. В Турции на основе смеси пшеничных хлопьев и кислого молока в результате спонтанного процесса брожения получают продукт «Тахрана», из которого наиболее часто выделяют штаммы молочнокислых бактерий видов *Pediococcus spp.*, *S. thermophilus*, *L. fermentum* и *E. faecium* [164]. Продукты, полученные в результате ферментации овощей («Гундрук», «Синки», «Кхалпи») и бамбука («Соидон», «Соихим»), используют в пищу в Гималаях [180]. В этих продуктах наиболее часто молочнокислое брожение осуществляют микроорганизмы видов *L. brevis*, *L. plantarum*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc fallax*. Кислое молоко «Куле Наото», употребляемое африканским племенем Масаи, также получают путем спонтанной ферментации. Доминирующей микрофлорой продукта являются молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, в меньшем количестве присутствуют молочнокислые бактерии родов *Enterococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc* [134]. Корейский продукт «Кимчи» получают на основе различных овощей, чаще всего китайской капусты. «Кимчи» рассматривается не только как

традиционная часть каждого приема пищи в Южной Корее, но и как продукт, оказывающий положительное воздействие на организм человека. По данным Lee и соавторов, из «Кимчи» чаще всего выделяют штаммы *L. sakei* [123].

Отбор наиболее успешных штаммов естественным образом происходил на протяжении всей истории использования молочнокислых микроорганизмов. С течением времени отбирались наиболее вкусные продукты с наилучшими органолептическими характеристиками. С появлением новейших методов молекулярной генетики и иммунологии, совместно с классическими методами микробиологии, изучение штаммов молочнокислых микроорганизмов движется быстрыми темпами и является чрезвычайно актуальным. Это связано с накоплением новых знаний о свойствах молочнокислых микроорганизмов и повышенным интересом потребителей к полезным продуктам – пробиотикам, получаемым на основе различных штаммов молочнокислых бактерий.

Наибольшее применение молочнокислые микроорганизмы нашли в пищевой промышленности, в частности для получения различных молочнокислых продуктов. В результате гидролиза молочного белка казеина эта группа бактерий образует различные аминокислоты и другие органические вещества, конечный состав которых имеет определяющее значение при созревании сыров: вкус, запах, текстура [145]. Йогурт, простокваша, мацони и другие подобные продукты получают во всем мире с помощью именно молочнокислых микроорганизмов. Кроме того, молочнокислые микроорганизмы используют в производстве вин, сыровяленых колбас, оливок, солений, для силосования кормов, получения молочной кислоты [62, 87, 102, 127, 150, 158].

1.2. Характеристика рода *Lactobacillus*

Лактобациллы являются одним из наиболее изучаемых представителей группы молочнокислых бактерий наряду со стрептококками, лактококками и энтерококками. Согласно современной филогенетической классификации бактерий род *Lactobacillus* имеет следующее положение: семейство *Lactobacillaceae*, порядок *Lactobacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*. Род *Lactobacillus* включает более ста пятидесяти видов и подвигов. Все представители этого рода имеют форму палочек, размер которых зависит не только от вида, но и от состава питательной среды. Клетки могут быть как короткими, коккообразными, так и нитеобразными, длинными. Размер клеток варьирует: 0,7-1,1 мк в ширину и 0,7-8,0 мк в длину [22]. Клетки чаще всего расположены длинными цепочками, однако встречаются короткие цепочки, клетки в парах и одиночные клетки.

Лактобациллы, вместе с другими представителями группы молочнокислых бактерий, имеют широкое применение в пищевой промышленности. При этом именно лактобациллы являются неотъемлемой составляющей различных ферментативных процессов, в то время как другие участники процесса могут отличаться. Так, в виноделии используют *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и *Oenococcus* [127]. Традиционно основой йогурта во всем мире считают *Streptococcus thermophilus* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* [133]. Для получения различных сортов сыра используют *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* [130, 170].

Лактобациллы являются обязательным представителем нормальной микробиоты человека и встречаются на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, как у взрослых, так и у детей. Однако у новорожденных в первые месяцы жизни лактобациллы выделяют редко [117]. В ротовой полости преобладают виды *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. paracasei* и общее количество лактобацилл составляет до 10^5 КОЕ/г [45]. Лактобациллы в количестве 10^2 - 10^3 КОЕ/г встречаются непосредственно в желудке, где pH составляет 2-3. Доминирующими видами в желудке являются *L. gasseri*, *L. reuteri* и *L. ruminis*. И по количеству и по видовому разнообразию наибольшее количество лактобацилл заселяет толстую кишку человека. Общее количество лактобацилл в этом отделе желудочно-кишечного тракта составляет до 10^8 КОЕ/г и преобладают следующие виды: *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. sakei* [98, 126]. Кроме того, лактобациллы являются доминирующей микрофлорой влагалища и играют огромную роль в защите от урогенитальных инфекций [5, 129, 132].

1.3. Характеристика рода *Enterococcus*

Род *Enterococcus* относится к семейству *Enterococaceae*, порядку *Lactobacillales*, классу *Bacilli*, типу *Firmicutes*. Как отдельный род *Enterococcus* возник в 1984 году на основании молекулярно-генетического анализа, до этого энтерококки классифицировали как стрептококки группы D [140, 163].

Клетки энтерококков имеют овальную форму, расположены в цепочках, по две или в виде одиночных клеток. Энтерококки способны развиваться при температуре от 5 до 50 °С, pH 4.6–9.9, в средах с содержанием 6,5 % NaCl и 40% желчи, устойчивы к нагреванию (30 мин, 60°C) [77, 183]. Устойчивость энтерококков к азиду натрия используется для создания селективных питательных сред. Всего род *Enterococcus* насчитывает 67 видов (данные на февраль 2020 г.), из них наиболее распространенными в природе и наиболее изучаемыми являются *E. faecium* и *E. faecalis* [74]. Эти два вида энтерококков - представители нормальной микробиоты человека, при

этом они являются одними из первых микроорганизмов, заселяющих желудочно-кишечный тракт новорожденных [6].

Бактерии рода *Enterococcus*, начиная с конца 80-х годов прошлого столетия, рассматривают как опасный агент, являющийся причиной оппортунистических инфекций и послеоперационных осложнений [86]. Наиболее часто эта характеристика относится к виду *E. faecalis*, однако и штаммы *E. faecium* иногда являются причиной инфекционной патологии [77]. В то же время энтерококки широко применяют в пищевой промышленности для получения молочнокислых продуктов, в том числе для созревания сыров [39, 176], получения сыровяленого мяса [53, 173]. Более того, энтерококки видов *E. faecium* и *E. faecalis*, в основном бактериоцин-продуцирующие, применяют во всем мире для получения лекарственных препаратов и продуктов – пробиотиков [2, 79, 100]. С помощью современных методов молекулярной генетики и биоинформатики показано, что существует два филогенетических кластера штаммов *E. faecium* – тип «патоген» и тип «комменсал». Более того принадлежность к одному из типов (патоген или комменсал) предопределена генетическими различиями, возникшими около 300000 лет назад [83].

Энтерококки являются частью нормальной микробиоты человека и животных [6, 77]. Наиболее часто из кишечника человека выделяют штаммы вида *E. faecium* и *E. faecalis*, реже другие виды. Энтерококки заселяют различные отделы желудочно-кишечного тракта человека, и встречаются как у новорожденных, так и у пожилых людей и их количество в кишечнике составляет от 10^4 до 10^9 КОЕ/г [77, 80].

1.4. Современные методы идентификации молочнокислых бактерий

В настоящее время в качестве рутинных методов для идентификации различных видов молочнокислых бактерий применяют три основных подхода – микробиологический, физико-химический и генетический. Идентификация микроорганизмов на основе методов микробиологии включает оценку культуральных и морфологических свойств колоний и клеток, а также оценку биохимической и физиологической активности штаммов на основании способности продуцировать и утилизировать различные органические и неорганические вещества. Идентификация микроорганизмов с помощью методов классической микробиологии занимает в среднем от 3 до 10 дней, является трудоемкой и, к сожалению, недостаточно точной [8, 131]. Более того, встречаются микроорганизмы, которые культивируется крайне плохо или вовсе относятся к не культивируемым [52]. Экспресс методы на основании антигенных и биохимических свойств бактерий, например API 50 CHL (Biomérieux, Франция), также широко применяются для идентификации бактерий. Однако отрицательной стороной этих методов

является неточность и невозможность интерпретации результатов в некоторых случаях, так как на результат теста может влиять сильное закисление среды или чрезмерная плотность бактериальной популяции [50, 51].

Метод физико-химической идентификации на основании масс-спектрометрии MALDI-TOF приобрел большую популярность в связи с возможностью в течение часа (кроме времени на культивирование микроорганизма) провести идентификацию бактерий до вида [42, 149]. Метод основан на определении спектра белков, получаемых в результате лазерной деструкции клеток микроорганизма и последующей ионизации белков. Метод является довольно точным, однако, крайне дорогим с учетом стоимости масс-спектрометра, расходных материалов, необходимых для одного запуска, а также стоимости базы данных референс-штаммов, так как единой общедоступной базы белковых бактериальных спектров нет [59].

С развитием новых методов расшифровки нуклеотидных последовательностей, называемых методами секвенирования нового поколения (NGS), расшифровка целого генома бактерий является быстрым и относительно недорогим способом идентификации микроорганизмов. Однако применение полногеномного секвенирования для идентификации новых бактериальных изолятов является далеко не самым оптимальным решением. Такие методы как ПЦР с видоспецифичными праймерами или секвенирование отдельных участков генома бактерий, являются не такими трудоемкими, менее дорогостоящими и более быстрыми способами для определения рода и вида исследуемого микроорганизма.

Наиболее распространенным методом идентификации бактерий является метод 16S рРНК типирования. Метод основан на секвенировании участка геномной ДНК, кодирующего 16S субъединицу рибосом. Этот участок является высоко консервативным для каждого из видов бактерий и используется для филогенетического анализа и таксономической классификации. Этот метод является общепризнанным, он дает точный результат, не требует серьезных трудозатрат, не дорогой, но все же довольно много времени требуется для получения ПЦР продукта, его секвенирования и последующего анализа последовательности.

Точность видовой идентификации микроорганизма при использовании метода ПЦР напрямую зависит от качества составленных ДНК-праймеров, их гомологии с ДНК микроорганизма только определенного вида. Существует несколько разновидностей ПЦР для определения видовой принадлежности молочнокислых бактерий – классическая ПЦР, ПЦР в реальном времени и мультиплексная ПЦР. ДНК-праймеры, используемые для идентификации молочнокислых бактерий, могут быть гомологичны генам, кодирующим ферменты, встречающимися только у определенных видов или генам, кодирующим переменные участки между генами, кодирующими 16S и 23S субъединицы рибосом. Классическую ПЦР удобно

использовать для идентификации штаммов, видовая принадлежность которых уже предварительно установлена с помощью других методов, например микробиологических или экспресс-методов. В другом случае идентификация с помощью ПЦР будет крайне трудоемким процессом. В случае генетического анализа новых штаммов молочнокислых бактерий более быстрым методом идентификации является мультиплексная ПЦР. Этот вид полимеразной цепной реакции, при использовании для идентификации бактерий, предполагает внесение в реакционную смесь образца ДНК исследуемого штамма и не одной пары праймеров, а нескольких. Количество пар в одной реакции может быть две и более и каждая пара праймеров гомологична отдельному роду или виду бактерий. Кроме того, каждая пара праймеров имеет свой характерный размер ожидаемого фрагмента (в результате амплификации). По размеру фрагмента, полученного в результате ПЦР, можно установить к какому роду/виду относится исследуемый штамм. Метод мультиплексной ПЦР является доступным и быстрым способом идентификации бактерий и поэтому широко используется для идентификации различных патогенов, как в исследовательских лабораториях, так и в клинической практике [110, 190]. Применительно к молочнокислым бактериям, была показана эффективность мультиплексной ПЦР для идентификации различных видов лактобацилл, заселяющих урогенитальный тракт женщин [203].

Существуют и другие методы генетической идентификации молочнокислых бактерий, такие как PFGE (электрофорез ДНК в пульсирующем электрическом поле) или RAPD (случайно амплифицированная полиморфная ДНК), но они в основном направлены на получение специфических дополнительных характеристик штаммов, применяемых для их паспортизации. Недостатком обоих методов является трудоемкость, низкая воспроизводимость, а также сложность идентификации микроорганизмов по профилю полученных ампликонов, предполагающую сравнение профилей образца и референс-штамма.

Наиболее оптимальным вариантом идентификации молочнокислых микроорганизмов является комбинация различных методов, позволяющих точно, до штамма, идентифицировать микроорганизм. Однако выбор метода идентификации новых штаммов бактерий зависит, в первую очередь, от поставленных перед исследователем задач. В случае исследования новых штаммов лактобацилл и энтерококков логичным является первичное изучение их микробиологических свойств, получение информации о морфологии клеток и колоний, условий культивирования и других фенотипических свойствах. Далее, по мнению автора, наиболее быстрым и дешевым способом видовой идентификации является использование классической или мультиплексной ПЦР с видоспецифичными праймерами. В некоторых спорных случаях,

метод 16S рРНК типирования может быть использован для подтверждения полученных результатов.

1.5. Пробиотики и их применение

Пробиотиками в настоящее время называют живые микроорганизмы, которые будучи включенными в состав фармакологических препаратов или пищевых продуктов, способны оказывать благотворное воздействие на организм хозяина [151].

Сейчас пробиотики в виде фармакологических препаратов, биологически-активных добавок и пищевых продуктов широко применяются во всем мире. Ежегодно публикуются результаты клинических исследований различных пробиотиков, наряду с исследованиями, направленными на поиск новых пробиотических штаммов.

Человек на протяжении веков развивался совместно с триллионами микроорганизмов, заселяющих его тело. Количество микроорганизмов, колонизирующих организм человека, превышает число собственных клеток организма человека в десять раз [95]. Не удивительно, что это микробное сообщество играет важную роль для здоровья человека. Принимать молочнокислые микроорганизмы в виде чистых культур предлагал еще в 1901 году И.И. Мечников [25]. «Я воздерживаюсь от всякой сырой пищи и, сверх того, ввожу в свой обиход молочнокислые микробы, мешающие загниванию в кишках» [24]. Именно с этим «загниванием в кишках» ученый связывал преждевременное старение и плохое самочувствие.

Наибольшее количество микроорганизмов заселяют пять участков нашего тела - кожа, кишечник, ротовая полость, нос и половые органы. Эти микроорганизмы, являющиеся неотъемлемой частью человека, называют микробиота, а человек и его микробиота рассматриваются как единый «суперорганизм» [188]. Микробиота человека несет ряд белков и ферментов, которые не кодируются геномом человека, и выполняет функции, на которые наш организм не способен [46]. Микробиота участвует в метаболизме ксенобиотиков, гликанов, аминокислот, в биосинтезе витаминов и изопреноидов [85, 206]. Микробиота утилизирует не перевариваемые компоненты пищи, повышая их биодоступность для макроорганизма [115, 166]. Кишечная микробиота играет важнейшую роль в регуляции восприимчивости организма хозяина к инфекциям, вызываемым патогенными микроорганизмами и вирусами [10, 143, 148]. Fukuda с соавторами показали, что благодаря способности синтезировать ацетат, некоторые штаммы бифидобактерий, способны защищать от инфекции, вызванной энтеропатогенной кишечной палочкой [81].

Микробиота каждого человека индивидуальна, находится в постоянном движении и подвержена различным изменениям, в том числе и не благоприятным [187]. Нарушения режима

питания, стрессы, экологическая обстановка, прием лекарственных препаратов и, в первую очередь, антибиотиков, – все это может вызывать нарушения кишечного гомеостаза и приводить к возникновению дисбиоза. И, не являясь заболеванием как таковым, дисбиоз, вызывая системные изменения в организме, создает условия, которые способствуют возникновению таких заболеваний, как гастрит и язвенная болезнь желудка [91], синдром раздраженного кишечника [94], нарушение обмена веществ [54, 186], аллергии [128, 146], гинекологические заболевания [132], злокачественные опухоли толстой кишки [207]. Микробный дисбаланс может приводить к заболеваниям, связанным с нарушениями работы иммунной системы. Так, наблюдается взаимосвязь между лечением антибиотиками в раннем детстве и частотой возникновения астмы [200]. Потому действия, направленные на поддержание микробного баланса организма, являются крайне актуальными.

Пробиотики на основе штаммов молочнокислых микроорганизмов являются одними из наиболее распространенных во всем мире. Наиболее «знаменитым» в Европе штаммом является *Lactobacillus rhamnosus* GG, на основе которого производится огромное количество кисломолочных продуктов. Применение пробиотиков на основе *L. rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* в профилактических целях существенно снижает риск развития, а также длительность диареи различной этиологии, как у взрослых так у детей [161, 193]. В азиатских странах распространен штамм *Lactobacillus casei* Shirota, на основе которого получают молочнокислый продукт «Якулт». Данный штамм показал свою эффективность в улучшении состояния здоровья пациентов с хроническими запорами [114]. Употребление закваски на основе *L. casei* Shirota снижало частоту возникновения и длительность течения заболеваний верхних дыхательных путей [167]. Молочнокислые закваски на основе штаммов *Lactobacillus gasseri* DSM 22583, *L. crispatus* DSM 22566, *L. rhamnosus* DSM 22560 и *Lactobacillus jensenii* DSM 22567 показали свою эффективность в лечении бактериального вагиноза у женщин [121].

Первые в России пробиотические препараты, содержащие лактобациллы, начали производить в 1973 году на основе штамма *L. plantarum* 8P-A3 [27]. Долгое время этот штамм был основой препарата «Лактобактерин». В настоящие дни *L. plantarum* 8P-A3 активно применяется в нашей стране и входит в состав таких препаратов как «Биовестин-Лакто», «Флорин Форте». Препараты на основе *L. plantarum* 8P-A3 эффективны в лечении дисбиотических состояний, диареи различной этиологии, бактериального вагиноза, в комплексной терапии *H. pylori* - ассоциированных состояний [36, 37, 38].

Кроме препаратов на основе лактобацилл широко используются пробиотики, содержащие энтерококки. Так, исследователи из Германии показали, что штамм *E. faecium* NCIMB 10415

способен ингибировать развитие вируса свиного гриппа в экспериментах *in vitro* [195]. Suzuki с соавторами докладывают о способности штамма *E. faecium* WB2000 замедлять формирование биопленок кариогенными штаммами стрептококков [178]. Штамм *E. faecium* SF68 применяется для лечения и профилактики диареи различной этиологии, в том числе у детей и новорожденных [100]. Наиболее известными препаратами в России, содержащими штаммы *E. faecium* являются «Линекс» и «Бифиформ». С 1995 года ООО Авена, выпускает БАД Ламинолакт, содержащий в своей основе *E. faecium* L3. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* была показана способность штамма *E. faecium* L3 подавлять рост *H. pylori* [4, 29, 32]. Di Piero с соавторами докладывают о эффективности применения пробиотика на основе *E. faecium* L3 для профилактики атопического дерматита у детей [67].

Пробиотики широко применяют в педиатрии, особенно у недоношенных детей первых дней жизни с целью формирования нормальной микробиоты, поддержания организма ребенка, для профилактики и лечения гастроэнтерита, энтероколита, атопического дерматита [3, 21, 47 64, 73, 191]. Многократно было показано положительное воздействие приема *E. faecium* L3 при выхаживании недоношенных детей в первые недели жизни [11, 23]. Показано, что рутинное применение пробиотиков в медицинской практике для недоношенных детей снижает смертность среди этой группы пациентов [201]. Однако, из-за отсутствия единого протокола применения пробиотиков в клинической практике, снижается эффективность пробиотической терапии [65].

1.6. Пробиотики на основе собственных штаммов микробиоты

Впервые использовать собственные штаммы микробиоты для профилактики дисбактериоза после приема антибиотиков и лечения кишечных инфекций, было предложено Коршуновым В.М. с соавторами в 1987 году. Авторы докладывают об эффективности применения индигенных штаммов лактобацилл и бифидобактерий, выделенных от пациентов непосредственно перед антибиотикотерапией, для профилактики дисбактериоза и сокращения сроков лечения кишечных инфекций [30]. В течение 5 дней антибиотикотерапии пациенты с кишечной инфекцией принимали аутопробиотики, состоящие из смеси собственных лакто- и бифидобактерий, для предотвращения дисбактериоза и сокращения времени лечения. Отличительной особенностью аутопробиотиков является их сродство к пациенту - ожидается, что штамм-пробиотик, полученный индивидуально от пациента, будет мягко и эффективно способствовать восстановлению нормального (исходного) состояния ЖКТ. Идея, впервые опубликованная Коршуновым В.М. с соавторами, нашла свое развитие в работах других российских ученых. Так, в 1999 году Шендеров Б.А. с соавторами предложил создание

аутопробиотического комплекса на основе разбавленного кишечного содержимого пациентов, обогащенного лакто- и бифидобактериями [28]. Однако данный способ имеет два основных недостатка – неизвестный конечный состав аутопробиотического комплекса, включающего различный набор бактериальных штаммов, и, в связи с этим, неосуществимость оценки безопасности созданного аутопробиотика для пациента. Недостатком способа, предложенного Коршуновым В.М., является отсутствие в протоколе автора определения видовой принадлежности штаммов, отобранных в качестве аутопробиотиков, а значит невозможность контроля качества конечного продукта.

1.7. Биологическая активность пробиотиков на основе молочнокислых бактерий

1.7.1. Критерии оценки биологической активности пробиотиков

В настоящее время единого протокола оценки пробиотического потенциала перспективных штаммов молочнокислых бактерий не существует. Сотрудники ирландского Университетского колледжа Корка первыми предложили комплекс для оценки пробиотических свойств бактерий *in vitro*, различные модификации которого используют ученые во всем мире до настоящего времени [70]. Согласно К. Дунн с соавторами потенциальные пробиотики должны быть устойчивы к низким рН и присутствию желчных солей и обладать антимикробной активностью. Устойчивость к низким рН и присутствию желчи необходимы потенциальным штаммам пробиотикам для выживания при попадании в желудок и верхние отделы кишечника. Антимикробная активность предполагает способность подавлять рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и является одной из наиболее важных характеристик штаммов-пробиотиков других микроорганизмов.

Спектр антагонистической активности носит индивидуальный характер и является уникальным для каждого штамма пробиотика. Было показано, что лактобациллы способны подавлять рост стафилококков *in vitro* и *in vivo* [168]. Многократно было показано, что различные виды лактобацилл ингибируют рост и превращают формирование биопленок кариогенных штаммов *Streptococcus mutans* [119, 196, 198]. Сотрудниками Отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» была показана способность энтерококков подавлять рост стрептококков групп А и В [14, 16] и *H.pylori in vitro* и *in vivo* [29, 32].

Механизм антагонистического действия молочнокислых бактерий связывают с их способностью вырабатывать большое количество веществ, обладающих антимикробными свойствами – перекись водорода, молочная и другие органические кислоты, дефензин-подобные пептиды, бактериоцины, ферменты с антимикробной активностью (лизоцим).

Способность продуцировать бактериоцины является одной из наиболее перспективных характеристик пробиотических штаммов для биотехнологии из-за повышенной конкурентоспособности таких штаммов. Эта способность является важной для микроорганизма, она дает преимущество в конкурентной борьбе за свое место в сложных экосистемах, одной из которых является микробиота человека. Так как наличие антагонистической активности является одним из обязательных свойств пробиотических бактерий, а способность синтезировать бактериоцины является одним из залогов высоких антагонистических свойств штаммов-пробиотиков, то анализ бактериоциногенности пробиотических штаммов является важным шагом в их изучении.

Бактериоцинами называют антимикробные вещества белковой природы, продуцируемые многими видами микроорганизмов, убивающие или тормозящие рост родственных видов, или имеющие более широкий спектр антибактериального действия. Способность продуцировать бактериоцины является распространенной среди молочнокислых бактерий. Спектр антагонистической активности бактериоцинов молочнокислых бактерий относительно узок, по сравнению с антимикробными пептидами, синтезируемыми эукариотическими клетками (плеврочин, например). Однако, бактериоцины, синтезируемые молочнокислыми бактериями, проявляют свою активность в гораздо меньшей концентрации, чем эукариотические антимикробные пептиды, и связано это с тем, что они взаимодействуют со специфическими рецепторами на поверхности клеточной стенки патогена [69].

Бактериоцин-синтезирующие молочнокислые бактерии применяют на различных пищевых производствах: в производстве молочнокислых заквасок (для повышения конкурентоспособности), в созревании колбас (антилистериальный эффект) и в производстве сыров (антилистериальный и антикlostридиальный эффекты). При использовании бактериоцин-продуцирующих культур образующиеся антимикробные пептиды обеспечивают подавление посторонней микрофлоры. Например, при производстве колбасы в качестве заквасочной культуры используется штамм *L. casei* LTH 1174, образующий курвацин А, который ингибирует рост близкородственных видов и условно патогенных бактерий и обеспечивает этим безопасное протекание микробиологических процессов при созревании сухой колбасы и в дальнейшем способствует сохранности получаемого продукта [61, 84]. Было показано, что штамм *E. faecium* D081821, применяемый для производства тайваньских ферментированных бобов (доочи), синтезирует энтероцин TW21 [55]. Штамм *L. rhamnosus* 160, выделенный из вагинальной микрофлоры здоровой женщины, является продуцентом лактоцина 160. Этот лактоцин подавляет рост большинства видов микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом [61]. Пробиотический штамм российского происхождения *E. faecium*

L3, отличающийся высокими антагонистическими свойствами к целому ряду патогенных бактерий, несет в своем геноме гены, кодирующие синтез энтероцинов А, В, Х [14, 32]. Среди лактобацилл, штаммы вида *L. plantarum* известны своими высокими антагонистическими свойствами по отношению к широкому спектру микроорганизмов. Эту способность связывают со способностью штаммов *L. plantarum* продуцировать сразу несколько бактериоцинов - плантарицинов JK, EF, NC8, S и А [41, 88, 172].

Следующим критерием для оценки перспективности штаммов пробиотиков является отсутствие у них устойчивости к антибиотикам. Обоснованное беспокойство относительно распространения множественной антибиотикоустойчивости среди бактериальных патогенов, привело к необходимости определения спектра устойчивости к антибиотикам для пробиотиков из-за возможности горизонтального переноса генов устойчивости к представителям условно-патогенной микрофлоры.

Кроме оценки спектра антимикробной активности пробиотиков и изучения механизмов, их обуславливающих, непосредственно способность положительно воздействовать на организм хозяина является наиважнейшим показателем перспективности новых штаммов пробиотиков. Свойства штаммов пробиотиков оценивают на экспериментальных моделях с использованием лабораторных животных. С помощью исследований на моделях *in vivo* была показана эффективность применения пробиотиков на основе *L. rhamnosus* и *L. acidophilus* для снижения побочных эффектов химиотерапии [204]. В Отделе молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» доктором медицинских наук Ермоленко Е.И. была разработана и успешно применяется модель индуцированного дисбиоза с использованием лабораторных крыс [15, 17]. Модель используется для изучения способности различных пробиотиков восстанавливать микробный баланс после антибиотикотерапии.

1.7.2. Безопасность пробиотиков

В настоящее время существует ряд организаций, контролирующих безопасность продуктов, содержащих живые микроорганизмы. Наиболее влиятельным является Европейский Департамент Безопасности Пищевых Продуктов (European Food Safety Authority) или EFSA. Именно эта организация занимается разработкой схемы анализа новых штаммов микроорганизмов – кандидатов в пробиотики. В качестве руководства по организации исследования новых пробиотических штаммов EFSA одобряет систему, называемую QPS (Qualified Presumption of Safety). Протокол QPS предполагает следующие шаги в исследовании безопасности новых штаммов, предлагаемых в качестве пробиотических: 1) определение видовой принадлежности микроорганизма; 2) сбор информации об истории применения

штамма, научных публикациях, применения в промышленности; 3) исключение патогенности; 4) определение области применения [157]. Более того, пробиотики, которые имеют длительную историю применения и доказали свою эффективность и безопасность на протяжении всего периода использования, могут рассчитывать на одобрение к применению со стороны EFSA без проведения большого количества дополнительных исследований.

Salminen M.R. с соавторами провели исследование, направленное на анализ зависимости увеличения частоты применения пробиотика на основе штамма *L. rhamnosus* GG и случаев возникновения бактериемий, вызванных видом *Lactobacillus* spp. в период с 1995 по 2000 годы в Финляндии. Авторы утверждают, что за исследуемый период процент случаев бактериемий, вызванных лактобациллами, не увеличивался и составлял 0,03% (от всех пациентов с бактериемией) [155]. Другое исследование провели ученые из США: Simkins J. и соавторы проанализировали все случаи септических инфекций, зарегистрированных в одном из больших медицинских центров в период с 2000 по 2008 годы. Авторы показали, что количество случаев бактериемий, вызванных пробиотическими лактобациллами *L. acidophilus* или *L. bulgaricus* у пациентов, принимавших пробиотики на основе этих микроорганизмов, было невелико и составляло 0,2% (от всех пациентов, принимавших пробиотик за весь период исследования) [169]. Несмотря на то, что вышеприведенные исследования доказывают относительную безопасность применения лактобацилл в качестве пробиотиков, даже для пациентов, входящих в группы риска, в литературе описано несколько тяжелых случаев септической инфекции, вызванной лактобациллами [177]. О случаях инфекционного эндокардита и бактериемии было доложено в научной литературе [160, 171, 184]. В большинстве случаев септические инфекции, вызванные лактобациллами, развиваются у пациентов в качестве сопутствующих заболеваний во время или после лечения основного, часто тяжелого, заболевания [103]. И, несмотря на то что бактериемия, вызванная лактобациллами, редко приводит к смерти, развитие такой бактериемии у пациентов на фоне основного заболевания воспринимают как показатель резкого ухудшения состояния или даже близкой смерти пациента [48, 103, 160].

Очевидно, что безопасность того или иного пробиотического препарата напрямую связана со штаммом микроорганизма, входящего в его состав. Поэтому исследование безопасности пробиотических препаратов должно быть направлено на изучение патогенных свойств входящих в его состав микроорганизмов. Так, известно, что штаммы *E. faecium* имеют спорное положение в списке видов микроорганизмов, применяемых для создания пробиотиков. Если лактобациллы и бифидобактерии признаны ВОЗ «generally recognized as safe» (GRAS) [93, 197], то применение штаммов энтерококков для создания пробиотиков требует дополнительных доказательств их безопасности. В настоящее время показано, что штаммы *E. faecium*,

вызывающие оппортунистические инфекции, генетически отличаются от штаммов, ассоциированных с нормальной микробиотой человека [83]. Условно-патогенные штаммы *E. faecium* наиболее часто несут в своем геноме гены и острова патогенности, гены устойчивости к антибиотикам и гены, кодирующие различные адгезины (Таблица 6).

Таблица 6 - Потенциальные факторы патогенности энтерококков [6].

Функция	Фактор	Ген(ы)
Адгезия и колонизация	Капсула	<i>cps</i>
	Адгезин Esp	<i>esp</i>
	Адгезин Asa	<i>asal</i>
	Адгезин EfaA	<i>efaA</i>
	Фактор агрегации	<i>agg</i>
	Рецептор коллагена	<i>ase</i>
Пенетрация, колонизация, повреждение тканей	Желатиназа	<i>gelE</i>
	Сериновая протеиназа	<i>spr</i>
	Fsr-регулятор	<i>fsr</i>
	Гиалуронидаза	<i>hylEfm</i>
	Цитолизин	<i>cyl</i>
Устойчивость к антибиотикам и микробицидным факторам организма	Устойчивость к антибиотикам	<i>tet M,</i> <i>van A,B,C</i> <i>ery A,B</i>
	Фактор устойчивости к желчным кислотам	<i>bsh</i> <i>gls B</i>
Гемолиз, токсигенность, бактериоциногенность	Гемолизины	<i>hly</i> <i>cyl A,B,M</i>
	Цитолизины и бактериоцины	<i>cpd, cob, ccf</i>

Перечисленные в таблице 6 факторы патогенности энтерококков в основном являются потенциальными, вклад в вирулентность штаммов энтерококков доказана только относительно гена *esp* [7, 97]. Другие потенциальные факторы патогенности энтерококков, перечисленные в таблице, относятся к необходимым компонентам функционирования клеток. Так, адгезины необходимы для колонизации ЖКТ человека и животных, а гидролаза желчных кислот является необходимым ферментом для всех бактерий, обитающих в верхних отделах ЖКТ. Поэтому тщательный анализ штаммов *E. faecium*, рассматриваемых как кандидаты в пробиотики обязательно должен включать молекулярно-генетический анализ, который позволит исключить использование тех штаммов, которые несут в своем геноме детерминанты патогенности.

Исследование безопасности штаммов, предлагаемых для использования в качестве пробиотических препаратов, должно быть многосторонним и, в первую очередь, быть направленным на исключение возможности пробиотического штамма вызвать инфекционные процессы. Применение любых лекарственных препаратов сопряжено с определенным риском развития побочных эффектов, и при создании лекарственных препаратов на основе живых пробиотических микроорганизмов необходимо снизить риск развития побочных эффектов до

минимума. Для этого, новые штаммы микроорганизмов, предлагаемые для создания на их основе пробиотиков, должны проходить тщательный отбор.

1.8. Заключение

Продукты и препараты на основе штаммов молочнокислых бактерий весьма распространены во всем мире. Сейчас в аптеках и магазинах доступен большой ассортимент продуктов и препаратов, содержащих лактобациллы разных видов: *L. plantarum* и *L. fermentum* («Лактобактерин»), *L. acidophilus* («Ацилакт», «Нарине»), *L. casei* («Имунеле») и множество других. Кроме того, с давних времен в России используются в пищу соленые огурцы, кислая капуста, простокваша, творог - все эти продукты получают в процессе молочнокислого брожения и именно штаммы лактобацилл играют в этом ведущую роль. Perea Vélez с соавторами докладывают, что большинство протестированных ими йогуртов в Колумбии имеют в своем составе *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* [142].

Исследования, направленные на поиск и изучение новых штаммов молочнокислых микроорганизмов, распространены и актуальны во всем мире: Германия, Норвегия, Дания [113], Китай и Монголия [205], Тайланд [106], Япония [120], Африка [134]. Наиболее распространенными источниками выделения штаммов – кандидатов в пробиотики являются организм человека и пищевые продукты, получаемые путем спонтанного молочнокислого брожения. Различные ферментированные продукты являются обязательной частью национальной кухни во многих странах. В качестве сырья, для получения таких продуктов может выступать молоко, рыба, мясо, злаки, различные овощи. Штаммы молочнокислых микроорганизмов, лежащие в основе таких продуктов, полученных в результате молочнокислого брожения, прошли длительный путь эволюции и не случайно стали основой таких продуктов. Исторически, ферментирование сырья позволяло увеличить срок хранения продуктов. При этом продукт должен был сохранить питательную ценность и быть вкусным. Таким образом, постепенно отбирались культуры бактерий, оказывающих наиболее выраженное положительное воздействие на здоровье человека и на вкус конечного продукта. Исследование таких микробных сообществ и отдельных штаммов микроорганизмов, имеет важную фундаментальную значимость, предоставляющую информацию о распространенности различных видов молочнокислых микроорганизмов в разных частях мира. Кроме того, большой интерес направлен на выделение ранее не известных штаммов молочнокислых микроорганизмов, потенциальных пробиотиков и их характеристике.

Поиск новых штаммов пробиотиков направлен, в первую очередь, на поиск перспективных штаммов микроорганизмов, обладающих набором если не уникальных свойств,

то необходимых для решения той или иной задачи в рамках имеющейся проблемы. Характеристика штаммов пробиотиков с помощью комплекса современных методов молекулярной генетики и микробиологии необходима для получения для осознанного применения бактерий-пробиотиков для практического применения. В то время как препараты и продукты питания, содержащие лактобациллы и/или бифидобактерии, определены ВОЗ как «в целом признанные безопасными» («generally recognized as safe» или GRAS), пробиотики на основе энтерококков вызывают много споров в научном сообществе. Тем не менее, пробиотики на основе штаммов *E. faecium* успешно и безопасно применяются как в России («Линекс», «Ламинолакт», «Бифиформ»), так и в других странах: «Walthers Ecoflor» (Нидерланды), «Bioflorin» (Швейцария). Кроме того, в литературе встречаются доклады о новых штаммах *E. faecium*, перспективных для применения в качестве пробиотиков [181]. На примере данного вида молочнокислых бактерий отчетливо видна необходимость тщательного изучения свойств штаммов-пробиотиков и их безопасности с применением современных методов молекулярной генетики и микробиологии.

Анализ штаммов пробиотических микроорганизмов, как новых, так и уже известных, с применением современных методов микробиологии и молекулярной генетики является чрезвычайно актуальным. В процессе проведения исследований штаммов молочнокислых микроорганизмов выявляются новые свойства и ранее не известные факты, позволяющие накапливать фундаментальные знания о пробиотиках. Новые штаммы могут быть перспективными для создания продуктов питания, а также фармакологических пробиотических препаратов. Соотношение эмпирических данных, накопленных в процессе длительного применения штаммов на практике, с новыми фундаментальными знаниями о строении и свойствах штаммов и приведут к более обоснованному применению пробиотиков и поиску новых перспективных штаммов. Наиболее широко молочнокислые микроорганизмы используют в молочной и биотехнологической промышленности в качестве стартовых культур для получения различного рода молочнокислых и других продуктов, а также для получения фармакологических препаратов, биологически активных пищевых добавок, как для людей, так и для животных. Потому важность исследования как уже известных штаммов, так и поиск новых штаммов пробиотиков заключается не только в получении новых фундаментальных знаний об этих штаммах, но и в практическом применении полученных знаний в различных отраслях.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. Выделение молочнокислых микроорганизмов из национальных продуктов и пробиотических препаратов

Шесть штаммов молочнокислых микроорганизмов – *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2, *L. plantarum* 8P-A3, *E. faecium* L3 с помощью методов классической микробиологии были изолированы из молочнокислых продуктов и пробиотиков, используемых на территории России и стран ближнего зарубежья (Таблица 7). *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 изолированы из молочнокислого продукта «Чакка». *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2 изолированы из молочнокислого продукта «Мацони». Оба продукта получают в домашних условиях путем внесения заквашенного молока в новую порцию свежего молока. Штаммы *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3 использовались в данной работе в качестве контрольных, так как обладают рядом доказанных свойств, присущих пробиотикам, и зарекомендовали себя как эффективные и безопасные [14, 37, 111, 202].

Таблица 7 - Морфология колоний и клеток исследуемых культур

Культура	Описание колоний	Описание клеток
<i>L.delbrueckii</i> TS1-06	Едва видные, светло-бежевые, неправильной формы колонии с неровным краем, размер от 1 до 3 мм, поверхность неровная, слабо блестит	Длинные палочки в цепочках или одиночные клетки, размер клеток 0,8-1,0x8,0-10,0 мкм
<i>L.fermentum</i> TS3-06	Круглые каплевидные бежевые колонии с ровным краем, размер 1-2 мм, поверхность гладкая, блестит	Короткие палочки в коротких цепочках размером 0,5-0,8x1,0-3,0 мкм
<i>L.delbrueckii</i> <i>subs.</i> <i>bulgaricus</i> LM1	Светло-бежевые с неоднородными вкраплениями, неправильной формы колонии с неровным краем, размер от 1 до 3 мм, поверхность неровная, слабо блестит	Длинные палочки в цепочках или одиночные клетки, размер клеток 0,7-1,0x8,0-9,0 мкм
<i>L.delbrueckii</i> <i>subs.</i> <i>bulgaricus</i> LM2	Светло-бежевые с неоднородными вкраплениями, неправильной формы колонии с неровным краем, размер от 1 до 3 мм, поверхность неровная, слабо блестит	Длинные палочки в цепочках или одиночные клетки, размер клеток 0,7-1,0x8,0-10,0 мкм
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	Бело-бежевые колонии с ровным краем, размер 1-2 мм, поверхность гладкая, блестит	Короткие палочки в коротких цепочках или одиночные клетки размером 0,6-0,9x2,0-4,0 мкм
<i>E. faecium</i> L3	Круглые светло бежевые колонии с ровным краем, размер 1-2 мм, поверхность гладкая, блестит	Овальные клетки в коротких цепочках или одиночные, размер клеток 0,6-0,8x0,8-2,0 мкм

2.2. Исследование адаптационных свойств исследуемых микроорганизмов

При попадании в желудочно-кишечный тракт человека пробиотические микроорганизмы сталкиваются с двумя основными биологическими барьерами: условия высокой кислотности в желудке (рН 1,5-3,0) и условия высокого содержания желчи в тонкой кишке. Очевидно, что микроорганизму необходимо выжить в подобных условиях, прежде чем проявить свои пробиотические свойства. Устойчивость к низким рН и содержанию желчи в среде является важным адаптационным фактором молочнокислых микроорганизмов – потенциальных пробиотиков.

Для исследования способности развиваться в присутствии желчи в среде исследуемые культуры, выделенные из молочнокислых продуктов «Чакка» и «Мацони», выращивали в питательном бульоне с различным содержанием желчи. В качестве контрольной культуры, способной развиваться при содержании желчи в среде до 5 % использовали культуру *E. faecium* L3. Результаты проведенного исследования приведены в таблице 8.

Таблица 8 - Концентрация клеток исследуемых культур, выросших на среде с различным содержанием желчи

Конц. желчи в среде, %	Концентрация клеток микроорганизмов, lgКОЕ/мл				
	<i>L. delbrueckii</i> TS1-06	<i>L. fermentum</i> TS3-06	<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM1	<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM2	<i>E. faecium</i> L3
5	-	-	-	-	5,3±0,1
2,50	-	-	-	-	5,5±0,1
1,25	-	5,1±0,1	-	-	5,7±0,1
0,60	4,2±0,1	5,2±0,1	4,3±0,1	4,0±0,1	5,7±0,1
0,30	4,5±0,1	5,2±0,1	4,3±0,1	4,4±0,1	5,8±0,1
0,15	4,7±0,1	5,2±0,1	5,1±0,1	4,8±0,1	5,8±0,1
0	7,6±0,1	7,8±0,1	8,2±0,1	8,1±0,1	8,0±0,1

Из приведенной таблицы видно, что все штаммы были способны развиваться при содержании до 0,6% желчи в среде.

Для определения устойчивости микроорганизмов к низким рН использовали методику, предложенную К.Дунн и соавторами [70]. Результаты проведенного исследования приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Выживаемость исследуемых культур при различных значениях pH, lgKOE/мл

Культура	pH	Время инкубации, мин			
		0	5	30	60
<i>L. delbrueckii</i> TS1-06	1,2	8,0 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,0 ± 0,1	7,9 ± 0,1	5,3 ± 0,1	3,7 ± 0,1
<i>L. fermentum</i> TS3-06	1,2	8,8 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,9 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,7 ± 0,1
<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM1	1,2	8,0 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,0 ± 0,1	7,8 ± 0,1	4,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1
<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM2	1,2	8,0 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,0 ± 0,1	7,7 ± 0,1	4,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1
<i>E. faecium</i> L3	1,2	8,0 ± 0,1	7,9 ± 0,1	6,0 ± 0,1	0
	2,5	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	7,7 ± 0,1

Произведенный анализ способности микроорганизмов выживать в условиях, встречающихся внутри ЖКТ человека и животных и являющихся неблагоприятными для микроорганизмов, выявил, что наиболее стрессоустойчивым штаммом является контрольный штамм *E. faecium* L3. Из штаммов, изолированных из молочнокислых заквасок, штамм *L. fermentum* TS3-06 проявил себя как наиболее устойчивый. Все изолированные штаммы оказались способны выживать при pH 2,5.

2.3. Определение антагонистической активности микроорганизмов по отношению к грамположительным и грамотрицательным патогенным бактериям

Для определения антагонистической активности микроорганизмов по отношению к грамположительным и грамотрицательным патогенным бактериям использовали модифицированный метод двухслойного агара, предложенного д.б.н. Ермоленко Е.И. [14, 16].

В исследование антагонистической активности вошли культуры, выделенные из молочнокислых заквасок «Чакка» и «Мацони», а также контрольные культуры *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3.

Антагонистическую активность исследуемых культур выражали Минимальной Ингибирующей Концентрацией Антагониста (МИКА) – это минимальное количество антагониста, ингибирующего размножение патогенных бактерий. Минимальная Ингибирующая Концентрация Антагониста равная 4,4 lgKOE/мл для *L. delbrueckii* TS1-06 против *S. aureus* ATCC 25922 означает, что минимальное количество *L. delbrueckii* TS1-06, необходимое для подавления роста патогена, составляет 4,4 lgKOE/мл (или $2,5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл). Чем меньше численное значение МИКА, тем меньшее количество антагониста потребовалось на подавление роста патогена и тем сильнее антагонист.

Таблица 10 демонстрирует показатели минимальной ингибирующей концентрации по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, включая стафилококки, кишечную палочку и псевдомонады. Показатели минимальной ингибирующей концентрации по отношению к стрептококкам групп А и В отражены в таблицах 11 и 12, соответственно.

Исследование антагонистической активности молочнокислых микроорганизмов относительно всех штаммов индикаторных культур проводили в трех повторностях в трех независимых экспериментах.

Таблица 10 - Показатели минимальной ингибирующей концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов, по отношению к индикаторным культурам

Микроорганизм	МИКА, IgКОЕ/мл					
	TS1-06	TS3-06	LM1	LM2	8P-A3	L3
<i>S. aureus</i> ATCC 25922	4,4±0,1	-	3,6±0,2	4,2±0,3	3,8±0,5	3,2±0,2
<i>S. aureus</i> cl.is. 42	3,6±0,2	-	2,7±0,1	3,4±0,1	3,3±0,2	3,2±0,1
<i>S. aureus</i> cl.is. 60	3,6±0,4	-	3,6±0,3	4,0±0,3	3,3±0,2	3,2±0,2
<i>S. aureus</i> cl.is. 76	3,6±0,1	-	3,4±0,2	3,5±0,2	3,3±0,1	3,2±0,1
<i>S. aureus</i> 209	3,9±0,3	-	3,8±0,3	4,0±0,1	3,4±0,5	3,2±0,2
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5,4±0,2	-	4,2±0,3	4,0±0,3	3,8±0,5	3,3±0,1
<i>P. aeruginosa</i> cl.is. 1	-	7,0±0,6	6,4±0,5	-	2,3±0,1	2,2±0,1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4,9±0,2	-	4,4±0,4	4,1±0,3	3,3±0,5	3,3±0,1
<i>P. aeruginosa</i> cl.is. 2	4,6±0,1	4,0±0,1	3,4±0,2	3,0±0,1	3,3±0,2	3,3±0,2
<i>K. oxytoca</i> 49	4,6±0,1	8,0±0,5	2,4±0,1	3,0±0,2	2,3±0,2	2,2±0,1
<i>K. oxytoca</i> 74	4,6±0,2	8,0±0,5	4,4±0,3	3,9±0,3	2,3±0,2	2,2±0,2
<i>K. pneumoniae</i> SH	5,6±0,4	8,0±0,5	2,7±0,1	3,0±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1
<i>K. pneumoniae</i> 62	4,6±0,2	8,0±0,5	2,9±0,1	3,0±0,3	2,3±0,2	2,3±0,2
<i>K. pneumoniae</i> X	2,6±0,1	7,0±0,4	3,3±0,1	2,5±0,1	2,3±0,1	2,3±0,2
<i>E. coli</i> M15	1,9±0,1	4,0±0,2	2,4±0,1	2,0±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1
<i>E. coli</i> ATCC 25923	4,9±0,3	5,0±0,1	2,4±0,1	3,1±0,6	2,3±0,2	2,3±0,2
<i>E. coli</i> CS35	4,6±0,3	8,0±0,6	4,4±0,2	5,0±0,4	2,3±0,1	1,3±0,1

Из представленных результатов видно, что наиболее чувствительным штаммом к действию антагонистов явился штамм *E. coli* M15, а наиболее устойчивыми – штаммы *P. aeruginosa*. По степени антагонистической активности наиболее приближенным к уровню контрольных штаммов является штамм *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2. Хотя штамм не был способен подавлять рост *P. aeruginosa* cl.is. 1, средний уровень антагонистической активности был выше, чем у других 3 штаммов лактобацилл.

Результаты, представленные в таблице 11, иллюстрируют способность штаммов антагонистов подавлять рост стрептококков группы А. Наиболее эффективно с этой задачей справились контрольные штаммы, однако штамм *L. delbrueckii* TS1-06 также проявил высокие

антагонистические свойства и был способен подавлять рост штаммов *S. pyogenes* в концентрациях от 2,6 до 4,3 IgKOE/мл.

Таблица 11 - Показатели минимальной ингибирующей концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов, по отношению к *S. pyogenes*.

Микроорганизм	МИКА, IgKOE/мл					
	TS1-06	TS3-06	LM1	LM2	8P-A3	L3
<i>S. pyogenes</i> SF370	3,2±0,8	8,3±0,1	4,5±0,1	3,0±0,7	1,7±0,3	2,0±0,1
<i>S. pyogenes</i> NZ131	3,5±0,6	6,4±1,1	4,0±0,3	4,0±0,9	1,4±0,1	2,0±0,2
<i>S. pyogenes</i> 2	3,5±0,6	5,7±0,4	2,9±0,6	5,4±0,9	2,1±0,3	1,5±0,1
<i>S. pyogenes</i> 6	3,1±0,1	5,7±0,4	2,8±0,4	5,4±0,9	2,4±0,4	ND
<i>S. pyogenes</i> 14	2,8±0,3	5,2±0,7	2,8±0,3	5,4±0,9	2,1±0,3	1,5±0,1
<i>S. pyogenes</i> 7281	4,3±0,1	8,5±0,1	3,7±0,1	4,1±0,2	2,1±0,3	2,0±0,1
<i>S. pyogenes</i> 4/70	4,3±0,1	8,3±0,1	3,9±0,2	4,1±0,2	2,2±0,1	1,8±0,2
<i>S. pyogenes</i> 118	4,0±0,3	3,5±0,1	3,7±0,1	3,1±0,1	1,5±0,1	2,0±0,1
<i>S. pyogenes</i> 171	4,3±0,1	2,5±0,2	4,1±0,2	3,1±0,1	2,3±0,1	2,2±0,2
<i>S. pyogenes</i> 7761	3,4±0,1	8,0±0,5	3,7±0,2	3,1±0,2	1,8±0,1	2,0±0,1
<i>S. pyogenes</i> 152	2,6±0,2	2,5±0,2	3,7±0,1	3,2±0,2	1,8±0,2	1,8±0,1
<i>S. pyogenes</i> 128	2,6±0,2	2,5±0,2	3,7±0,2	3,1±0,1	2,3±0,1	2,0±0,1

Таблица 12 - Показатели минимальной ингибирующей концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов, по отношению к *Streptococcus agalactiae*

Микроорганизм	МИКА, IgKOE/мл					
	TS1-06	TS3-06	LM1	LM2	8P-A3	L3
<i>S. agalactiae</i> 2/86	3,9±0,5	-	5,2±0,5	3,6±0,8	2,7±0,3	3,8±0,3
<i>S. agalactiae</i> 1/92	3,9±0,5	-	5,2±0,5	3,6±0,8	2,7±0,3	3,7±0,3
<i>S. agalactiae</i> 60/59	3,2±0,6	-	4,9±0,4	3,6±0,8	2,7±0,3	1,9±0,2
<i>S. agalactiae</i> 1/82	3,8±0,5	-	4,6±0,2	3,6±0,8	2,9±0,4	3,9±0,3
<i>S. agalactiae</i> 090R	3,9±0,5	-	4,5±0,1	3,6±0,8	2,6±0,3	3,0±0,2
<i>S. agalactiae</i> 74-430	4,2±0,3	-	4,6±0,2	3,6±0,7	2,9±0,3	1,9±0,2
<i>S. agalactiae</i> 75-155	3,9±0,5	-	4,9±0,4	3,6±0,8	3,0±0,3	3,7±0,3
<i>S. agalactiae</i> 86	4,4±0,1	-	4,6±0,2	3,6±0,8	3,0±0,2	3,7±0,3
<i>S. agalactiae</i> 4272	3,9±0,5	-	4,6±0,2	3,6±0,7	3,1±0,3	3,9±0,2
<i>S. agalactiae</i> 6816	4,2±0,3	-	4,9±0,4	3,6±0,8	3,0±0,2	1,9±0,2
<i>S. agalactiae</i> 1706	4,5±0,1	-	5,2±0,5	3,6±0,8	3,2±0,3	2,1±0,2

Из представленных результатов видно, что штаммы *S. agalactiae* являются наиболее устойчивыми к действию молочнокислых микроорганизмов среди 40 исследуемых штаммов индикаторных культур. По среднему показателю МИКА наиболее чувствительными штаммы

S.agalactiae оказались к действию *E. faecium* L3, однако наиболее стабильны показатели подавления роста стрептококка штаммом *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2.

В результате исследования антибактериальной активности исследуемых молочнокислых микроорганизмов были определены МИКА в отношении всех индикаторных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Средние показатели минимальной ингибирующей концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов, по отношению к индикаторным культурам представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Средние показатели минимальной ингибирующей концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов, по отношению к индикаторным культурам

Микроорганизм	МИКА, lgКОЕ/мл					
	TS1-06	TS3-06	LM1	LM2	8P-A3	L3
<i>S. aureus</i>	3,8±0,3	-	3,4±0,3	3,8±0,3	3,4±0,2	3,2±0,2
<i>E. coli</i>	3,8±1,3	5,7±1,6	3,1±0,9	3,4±1,1	2,0±0,4	1,6±0,4
<i>P. aeruginosa</i>	4,8±0,2*	5,5±1,5*	4,7±1,1	3,6±0,6*	3,0±0,4	2,9±0,5
<i>K. oxytoca</i>	4,6±0,2	8,0±0,5	3,4±1,0	3,5±0,5	2,3±0,2	2,2±0,2
<i>K. pneumoniae</i>	4,3±1,1	7,7±0,4	3,0±0,2	2,8±0,2	2,3±0,2	2,3±0,2
<i>E. faecalis</i>	5,4±0,2	-	4,2±0,3	4,0±0,3	3,8±0,5	3,3±0,1
<i>S. pyogenes</i>	3,5±0,5	5,6±2,0 (2,5±0,2)**	3,6±0,4	3,9±0,8	2,0±0,3	1,9±0,2
<i>S. agalactiae</i>	4,0±0,3	-	4,8±0,2	3,6±0,8	2,9±0,2	3,0±0,8
СРЕДНЕЕ	4,3±0,5	6,5±1,1	3,8±0,6	3,6±0,3	2,7±0,6	2,6±0,6

Примечание: * Подавляет рост только некоторых штаммов патогенов внутри одного вида. Подробнее таблицы 11-13.

** Штамм *L. fermentum* TS3-06 обладает избирательной антагонистической активностью, способен подавлять рост трех из 12 штаммов стрептококков с МИКА 2,5±0,2 lgКОЕ/мл и не способен подавлять рост других штаммов СГА и СГВ.

Анализ результатов, полученных при исследовании антагонистической активности пробиотических культур по отношению к индикаторным культурам, показал, что молочнокислые микроорганизмы проявляли неодинаковую способность ингибировать рост отдельных штаммов патогенов. Так, показатель МИКА *E. faecium* L3 для наиболее чувствительного штамма *E. coli* CS35 был равен 1,3±0,1 lg КОЕ/мл, а для штамма *S. agalactiae* 1/82, продемонстрировавшего максимальную резистентность, эта величина была существенно больше и составляла 3,9±0,3 lg КОЕ /мл. Наиболее показательным в данном случае является штамм *L. fermentum* TS3-06, который в большинстве случаев не был способен подавить рост индикаторных штаммов патогенов. Так, штамм не подавлял рост ни одного из исследуемых штаммов стрептококка группы В. Однако, для подавления роста штамма *S. pyogenes* 152 потребовалось всего 2,5±0,2 lg КОЕ/мл, что соизмеримо с показателем МИКА для контрольных

штаммов. Кроме того, в ряде случаев МИКА пробиотических культур по отношению к одной и той же индикаторной культуре существенно отличались. Так, например, рост штамма *K. pneumoniae* SH в большей степени подавлялся культурами *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8A-P3 (МИКА $2,3 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл для обоих). Эти показатели для *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM2 составили $5,6 \pm 0,4$; $8,0 \pm 0,5$; $2,7 \pm 0,1$ и $3,0 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл, соответственно.

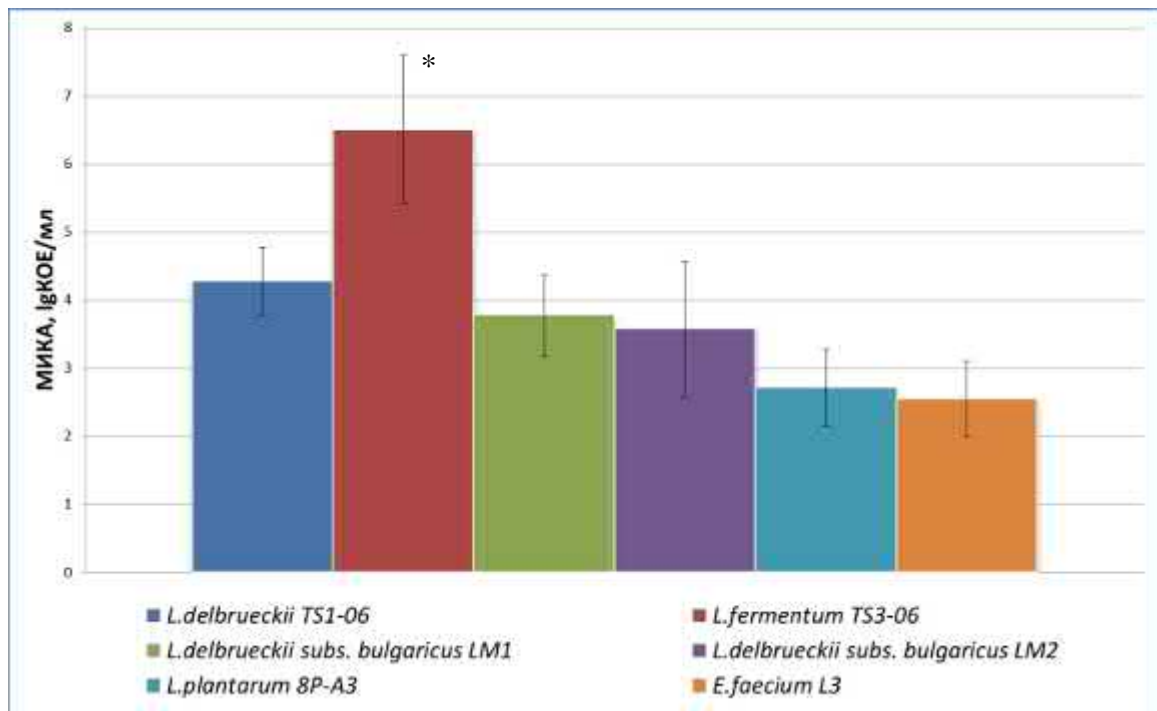


Рисунок 2 - Средние арифметические показатели минимальной ингибирующей концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов по отношению ко всем исследованным индикаторным культурам

Примечание: * $p < 0,05$

Из рисунка 2 видно, что наиболее выраженную антагонистическую активность проявили культуры *L. plantarum* 8P-A3 и *E. faecium* L3. Средняя МИКА для этих штаммов составляла $2,7 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл и $2,3 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл соответственно. Средним уровнем антагонистической активности в отношении исследованных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов обладали штаммы *L. delbrueckii* TS1-06, *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM2, с МИКА $4,3 \pm 0,5$ lg КОЕ/мл, $3,8 \pm 0,6$ lg КОЕ/мл и $2,6 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл, соответственно. Самые слабые антагонистические свойства из исследованных молочнокислых микроорганизмов проявил штамм *L. fermentum* TS3-06.

Для иллюстрации результатов исследования антагонистической активности молочнокислых микроорганизмов ниже приведены рисунки 3 и 4, демонстрирующие избирательность штамма *L. delbrueckii* TS1-06 в своей способности подавлять рост патогенов.

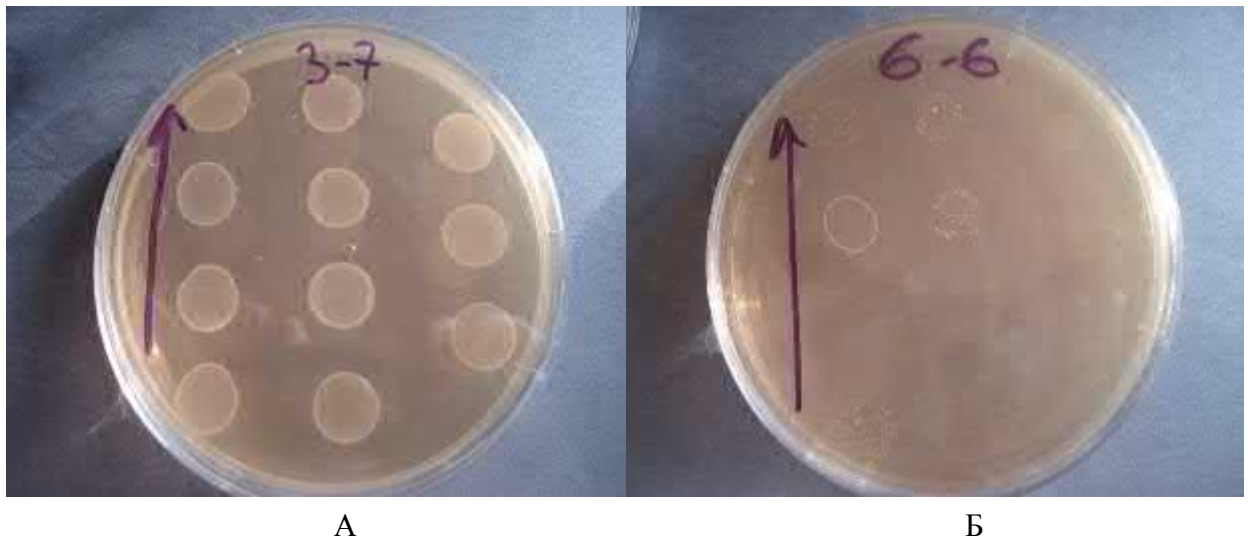


Рисунок 3 - Рост индикаторных штаммов *S. pyogenes* на чашках с двухслойным агаром
 Примечание: (А) Контроль: нет антагониста в нижнем слое агара. (Б) Опыт: 3,3 IgКОЕ/мл *L.delbrueckii* TS1-06 в нижнем слое агара

Очевидно, что на контрольной чашке Петри (Рисунок 3А) с двухслойным агаром без *L.delbrueckii* TS1-06 в нижнем слое выросли все 11 штаммов СГА. На опытной чашке (Рисунок 3Б), содержащей в нижнем слое 3,3 IgКОЕ/мл *L. delbrueckii* TS1-06, выросли только 6 из 11 штаммов СГА. Необходимо отметить характер роста штаммов СГА на поверхности агара – полноценный на контрольной чашке и слабый на опытной.

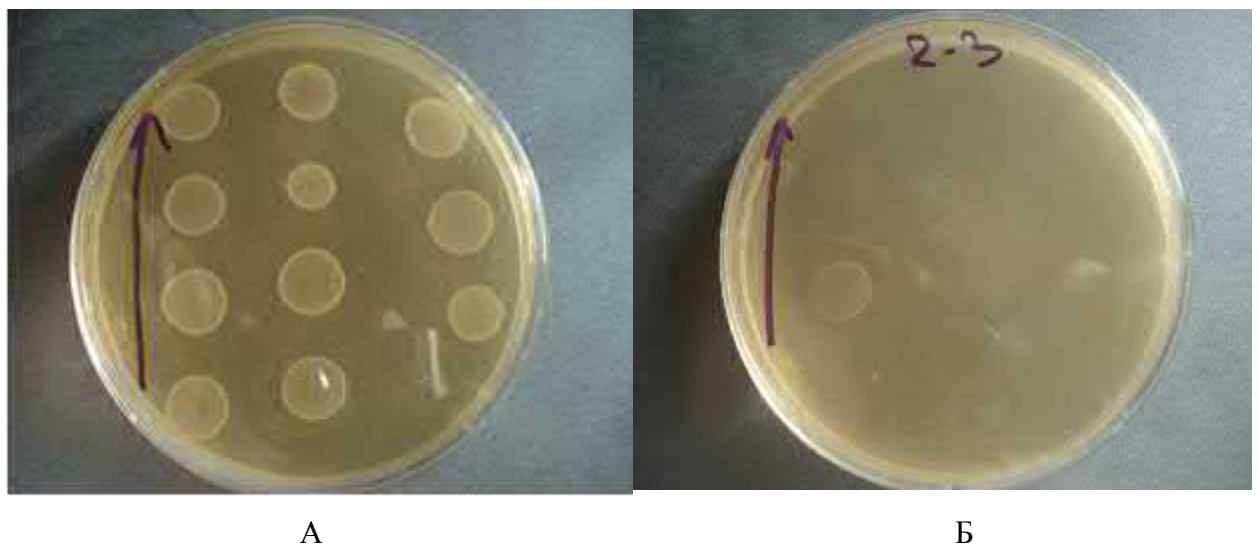


Рисунок 4 - Рост индикаторных штаммов *S. agalactiae* на чашках с двухслойным агаром
 Примечание: (А) Контроль: нет антагониста в нижнем слое агара. (Б) Опыт: 4,4 IgКОЕ/мл *L. delbrueckii* TS1-06 в нижнем слое агара

На рисунке 4 видно, что на поверхности агара опытной чашки, при наличии 4,4 IgКОЕ/мл *L. delbrueckii* TS1-06 в нижнем слое, вырос только один штамм СГВ из 11 индикаторных.

По результатам данного исследования можно заключить, что антагонистическая активность каждого из исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов является

индивидуальной и носит избирательный характер. Так, культура *L. fermentum* TS3-06, проявившая себя как слабый антагонист, была способна подавлять рост некоторых патогенов (*S. pyogenes*) в концентрациях, приближенных к контрольным штаммам ($2,5 \pm 0,2$ lgКОЕ/мл против $2,0 \pm 0,1$ lgКОЕ/мл). Такой результат может быть полезен для идеи прицельного использования штаммов пробиотиков. Когда известен возбудитель инфекции и имеется пробиотический штамм, способный специфично подавить рост нежелательного агента, не вызывая при этом дисбиотических нарушений.

В результате проведенного исследования были определены МИКА исследуемых молочнокислых микроорганизмов в отношении 40 индикаторных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. При анализе полученных результатов были отмечены общие тенденции в показателях МИКА для каждого из исследуемых молочнокислых микроорганизмов. Так, наибольшие значения МИКА к большинству индикаторных штаммов были характерны для культуры *L. fermentum* TS3-06. Средние МИКА были характерны для штаммов *L. delbrueckii* TS1-06, *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM2. Эти штаммы были способны подавлять рост почти всех индикаторных культур патогенов, однако средние показатели МИКА для этих штаммов были выше, чем показатели МИКА контрольных штаммов. Наиболее сильными антагонистами (по среднему показателю МИКА) проявили себя контрольные культуры *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3. Из четырех исследуемых штаммов лактобацилл, выделенных из молочнокислых продуктов, *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM2 проявила наибольшую антимикробную активность.

ГЛАВА 3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1. Создание ДНК праймеров для ПЦР

Способность синтезировать бактериоцины является важной характеристикой пробиотических штаммов, потому для изучения геномов исследуемых штаммов на наличие генов, кодирующих бактериоцины, были сконструированы специфические праймеры на гены наиболее распространенных бактериоцинов лактобацилл (Таблица 14). Для изучения строения плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3 на основании литературных данных и известных нуклеотидных последовательностей других бактериоцин-продуцирующих штаммов *L. plantarum* [68, 139, 153, 154] были сконструированы праймеры для исследования генетической организации локуса (Таблица 15). Для создания метода идентификации лактобацилл с использованием мультиплексной ПЦР были сконструированы видоспецифические праймеры на основе нуклеотидных последовательностей, кодирующих ферменты, характерные для определенных видов лактобацилл (Таблица 16). Все праймеры были сконструированы *de novo* на основании нуклеотидных последовательностей, имеющих в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Human Microbiome Project (<http://www.hmpdacc.org/>). Для создания и анализа праймеров использовали компьютерные программы Primer3Plus (<https://primer3plus.com>) и Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Праймеры были синтезированы коммерческой фирмой «Бигль» (Санкт-Петербург). Температурный профиль ПЦР был подобран по стандартной схеме, включающей общую денатурацию ДНК, отжиг праймеров и элонгацию фрагмента между праймерами.

Таблица 14 - Праймеры на гены, кодирующие бактериоцины

Название кодируемого геном белка	Нуклеотидная последовательность праймеров		Размер ожидаемого фрагмента
	прямой	обратный	
Лактоцин S	ctgagcttacacgcttctgc	tttgaagcaacctgcaacat	153
Лактоцин F	tagcagtcgttggtgga	cttgccaaaaccacctgttg	182
Лактоцин B	tgctgctgagccttgataa	ttggtggaggaaatcctaaag	170
Лактоцин 705	tccaagacgtccctttgt	gcatatggatgcacaagc	242
Сакацин P	aacagcaattacaggtggaaa	ttattattccagccagcgtt	151
Плантарицин A	ggggcgacaggagatttac	agaaacgcgttccgatttta	353
Сакацин A	aattaccggcggtagat	cattccagctaaaccactagcc	136
Плантарицин S	gtcgccaagtacctcgtt	atatccgatgtgcccatag	495
Плантарицин EF	gccagtggataggtgctaac	gggggagatcaacaattatgaa	458

Таблица 15 - Праймеры для исследования строения плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3

Название гена, гомологичного праймеру	Ориентация праймера	Нуклеотидная последовательность праймера
<i>napA1</i>	прямой	cggtcaggtgactgcaaac
<i>plnCB</i>	прямой	ggcaagagtagcttgtctca
<i>pln8C</i>	обратный	atacgtggcaaatgcctaaa
<i>plnORF3J51</i>	прямой	atctacgtcagcgcaaaaac
<i>plnORF4J51</i>	прямой	cggtttagcttcttctgctg
<i>plnR</i>	прямой	agtgaattcaaaatacgtagcgcatag
<i>plnR</i>	обратный	gattagtgatggggctgct
<i>plnL</i>	прямой	tagatgccgctccgtaaagt
<i>plnQ</i>	обратный	cacagctaaccacctagcc
<i>plnA</i>	обратный	ccccatctgcaagaatac
<i>plnC</i>	прямой	gggggacagggagatttac
<i>plnC</i>	обратный	agaaacgcgtccgatttta
Область перед <i>plnI</i>	прямой	gctcttagcggatcccaaaactcaga
<i>plnI</i>	прямой	gccagtggataggtgcttaac
Область между <i>plnF</i> и <i>plnE</i>	обратный	gggggagatcaacaattatgaa
Область за <i>plnE</i>	обратный	aacgaattcaagggggattattatgcta
<i>plnG</i>	прямой	ttacaaggggtcagctatcgtt
<i>plnG</i>	обратный	tcagtaattgcatccagtcac
<i>plnH</i>	прямой	tacacgatcaaggcaacca
<i>plnU</i>	обратный	tcaatcgagcaaccatacca
<i>plnU</i>	прямой	gttagcggatggctattgga
<i>plnW</i>	обратный	gtgtcatcgtaccggattt
<i>plnW</i>	прямой	tgattacggccaattggttt
<i>plnY</i>	обратный	aacgatccgacactccaag
Область за <i>plnJ</i>	обратный	agtgaattcaaaatacgtagcgcatag
<i>plnJ</i>	прямой	gcttcgcatcataaaatcc
<i>plnM</i>	обратный	cgcaaccatcaaaatacca
<i>plnN</i>	прямой	gtgaaatgcaaacgggactt
<i>plnO</i>	обратный	atcttcggacctctgatt
<i>plnP</i>	прямой	tgcattggcagaagaagt

Таблица 16 - Праймеры, используемые для генетической идентификации исследуемых культур

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров		Р-р ожид. фрагм
	прямой	обратный	
16S рРНК	tggtcaggatgaacgctgg	ttacccaccaacaagctaa	276
<i>L.plantarum</i> -спец	aagggatgctcaagtcattgtt	tccaaaactgctttgagtagg	499
<i>L.plantarum</i> -спец 2	gtattgattggtgcttgcacatga	agttaaactctctcaaaaacta	1536
<i>L.delbrueckii</i> - спец	gggtgatttgggacgctag	gccgccttcaaaactgaatc	137
<i>L.crispatus</i> - спец	agcgagcggaaactaacagattta	agctgatcatgcgatctgctt	133
<i>L.delbrueckii</i> group- специфичные	cgagaagagagagaaaactcaact	tcgctcggcctacttggga	279
<i>L.casei</i> group- спец	gcaccgagattcaacatgg	ggttcttggatctatgcggtattag	116
<i>L.rhamnosus</i> - спец	tgcttgcatttgatttaattttg	ggttcttggatctatgcggtattag	121
<i>L.salivarius</i> - спец	cgaactttcttacaccgaatgc	tgaacgggcggtgtgtacaag	1400
<i>L.reuteri</i> - спец	gctggtggttaggtaacttgg	taagcttcatgtcaccttgtgg	295
<i>L.fermentum</i> - спец	gtttgccaagaccacagtgata	gtagtcatggcgaggatcttt	396
<i>L.ruminis</i> - спец	tcgtcatcgtcaataatccgta	tgaagcagcaaatcgtgatac	502
<i>L.helveticus</i> - спец	ttaaacgtggcattcaacca	caagcattccaccgattttt	345
<i>L.acidophilus</i> - спец	atgcatttgacattggttttga	cagcacttgaatacgaacaag	603
<i>L.gasseri</i> - спец	atttgaaggcgtaccaagaat	tgaacgcatttcaagacgagta	700
<i>L.casei</i> - спец	ttaacgcgtgtaagggtgattc	tatgaattagccgatggacagg	800

3.2. Генетическая идентификация молочнокислых микроорганизмов

3.2.1. 16S рРНК типирование

Для генетической идентификации изолированных штаммов лактобацилл, отнесенных к видам *L. delbrueckii* и *L. fermentum* использовали метод 16S рРНК типирования. Для этого на матрице ДНК исследуемых штаммов была проведена ПЦР с праймерами, специфичными к участку, кодирующему 16S рРНК. После амплификации фрагменты ДНК были очищены и просеквенированы. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности были проанализированы с помощью методов компьютерного анализа. В результате анализа полученных последовательностей ДНК изолированные штаммы были отнесены к следующим видам: *L. delbrueckii* (97% гомологии), *L. fermentum* (100% гомологии) и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* (98% гомологии). Полученные нуклеотидные последовательности

были депонированы в GenBank NCBI и им были присвоены следующие идентификационные номера: *L. delbrueckii* TS1-06 - GenBank EU346727; *L. fermentum* TS3-06 - GenBank EU346728; *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LM1 - GenBank GU299484; *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LM2 - GenBank GU299485.

Таким образом, в результате проведенного исследования была установлена видовая принадлежность исследуемых штаммов лактобацилл.

3.2.2. Идентификация молочнокислых микроорганизмов с помощью ПЦР

Генетическую идентификацию молочнокислых микроорганизмов, выделенных их пробиотических препаратов «Лактобактерин сухой» и «Ламинолакт», проводили с использованием классической ПЦР. Инструкции производителей этих препаратов включали информацию о роде и виде микроорганизмов, включенных в состав препарата. Так, «Лактобактерин сухой» и «Ламинолакт» должны были содержать в своем составе *L. plantarum* 8P-A3 и *E. faecium* L3 соответственно. Поэтому, наиболее коротким путем для идентификации заявленных микроорганизмов явилась постановка ПЦР с ДНК-праймерами, специфичными к заявленным видам бактерий (Таблица 16).

Так, генетическую идентификацию штамма *L. plantarum* 8P-A3, изолированного из пробиотического препарата «Лактобактерин сухой», проводили с помощью постановки ПЦР с праймерами, специфичными к ДНК лактобацилл вида *L. plantarum*. Электрофореграмма результатов ПЦР на матрице ДНК *L. plantarum* 8P-A3 приведена на рисунке 5.

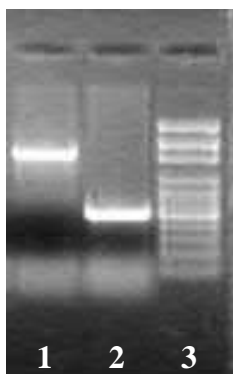


Рисунок 5 - Электрофореграмма результатов ПЦР на матрице хромосомной ДНК *L. plantarum* 8P-A3 с *L. plantarum*-специфичными праймерами

Примечание: 1 - Праймеры *L. plantarum*-спец 2; 2 - Праймеры *L. plantarum*-спец; 3 - Маркер мол. веса 100-1000, 1200, 1500, 2000 пн (100 bp DNA Ladder, Invitrogen)

Из приведенного рисунка 5 видно, что микроорганизм, изолированный из «Лактобактерина сухого» и предположительно являющийся *L. plantarum* 8P-A3 (как заявлено в инструкции производителя), действительно относится к виду *L. plantarum*. Это подтверждает

положительный результат ПЦР с двумя видами праймеров, гомологичными к ДНК этого вида микроорганизма.

Идентификацию штамма *E. faecium* L3, изолированного из пробиотического препарата «Ламинолакт», проводили с помощью постановки ПЦР с праймерами, специфичными к ДНК энтерококков вида *E. faecium*. На рисунке 6 приведена электрофореграмма результатов ПЦР на матрице ДНК *E. faecium* L3.

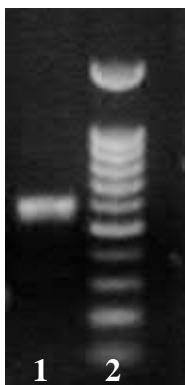


Рисунок 6 - Электрофореграмма результатов ПЦР на матрице хромосомной ДНК *E. faecium* L3 с *E. faecium*-специфичными праймерами
Примечание: 1 - Праймеры *E. faecium*-спец; 2 - Маркер мол. веса 100-1000, 1500 пн (100bp DNA Ladder, Promega)

Из приведенного рисунка видно, что ПЦР с праймерами *E. faecium*-спец на матрице ДНК предположительно *E. faecium* L3 дала положительный результат с образованием ожидаемого размера фрагмента. Таким образом, можно сделать вывод о том, что изолированный микроорганизм относится к виду *E. faecium*.

В результате проведения ПЦР и последующего электрофореза ДНК были получены электрофореграммы (Рисунки 5 и 6), подтверждающие, что именно виды *L. plantarum* и *E. faecium* были изолированы из продуктов «Лактобактерин сухой» и «Ламинолакт». Полученные данные соответствовали заявленным видам микроорганизмов в инструкциях производителей пробиотических препаратов.

3.2.3. Разработка метода идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР

На основании метода мультиплексной ПЦР нами был разработан быстрый, точный и экономичный способ определения вида лактобацилл, изолированных из различных источников.

Для этого нами были сконструированы специфические ДНК-праймеры, каждая пара которых была гомологична специфическому участку ДНК одного из 12 видов лактобацилл (Таблица 16). Для разработки метода были отобраны виды лактобацилл, наиболее часто

встречающиеся в ЖКТ человека [75]. Созданные праймеры позволяли идентифицировать следующие виды лактобацилл:

- группа *L. delbrueckii*: *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*
- группа *L. plantarum*: *L. plantarum*,
- группа *L. casei*: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*
- группа *L. reuteri*: *L. reuteri*, *L. fermentum*,
- группа *L. salivarius*: *L. salivarius*, *L. ruminis*.

Все праймеры были сконструированы таким образом, чтобы было возможным их объединение для использования в мультиплексных ПЦР (М-ПЦР). Согласно результатам компьютерного и литературного анализа все праймеры были разделены на две группы в зависимости от температуры плавления, возможности образования димеров, размера ожидаемого фрагмента и гомологии к определенному виду лактобацилл. Далее нами была проведена работа по оптимизации метода. Для этого праймеры были разбиты на несколько наборов для М-ПЦР. Особое внимание уделялось анализу результатов М-ПЦР, в которую попадали виды лактобацилл, относящиеся к одной филогенетической группе, для исключения перекрестного или ложного ответа ПЦР.

В качестве контрольных штаммов для оценки адекватности созданных М-ПЦР были отобраны следующие штаммы, изолированные из коммерческих препаратов: *L. plantarum* 8P-A3, *L. fermentum* 65, *L. acidophilus* Ацидофилус, *L. casei* DN114-001, *L. rhamnosus* K32, *L. reuteri* RC-14, *L. helveticus* Д75. Кроме того, штаммы *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2, изолированные из продуктов «Чакка» и «Мацони» и вид которых был установлен с помощью 16S рРНК типирования, также выступали в качестве объектов для оценки качества разработанного метода идентификации лактобацилл с помощью М-ПЦР.

Две первые пробные М-ПЦР были созданы с использованием всего шести пар праймеров, по три пары праймеров в каждой, температуры плавления которых были сходны и ожидаемый размер ампликона не повторялся. Состав этих М-ПЦР представлен в таблице 17.

Таблица 17 - Пробные наборы праймеров для постановки мультиплексной ПЦР.

М-ПЦР 1 (Тамп=52 ⁰ С)		М-ПЦР 2 (Тамп=53 ⁰ С)	
Праймеры	Ожид. р-р амп-на	Праймеры	Ожид. р-р амп-на
<i>L. crispatus</i>	133	<i>L. delbrueckii</i>	137
<i>L. reuteri</i>	295	<i>L. fermentum</i>	396
<i>L. ruminis</i>	502	<i>L. plantarum</i>	499

Такой вариант из двух наборов М-ПЦР был проанализирован в ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии (Москва) Ботиной С.Г. с использованием коллекции микроорганизмов,

включающей *L. delbrueckii* 19, *L. fermentum* КР1, *L. casei* КЗШ24, *L. helveticus* 100аш, *L. rhamnosus* 421-2. На рисунке 7 приведен результат проведенного анализа этих вариантов М-ПЦР.

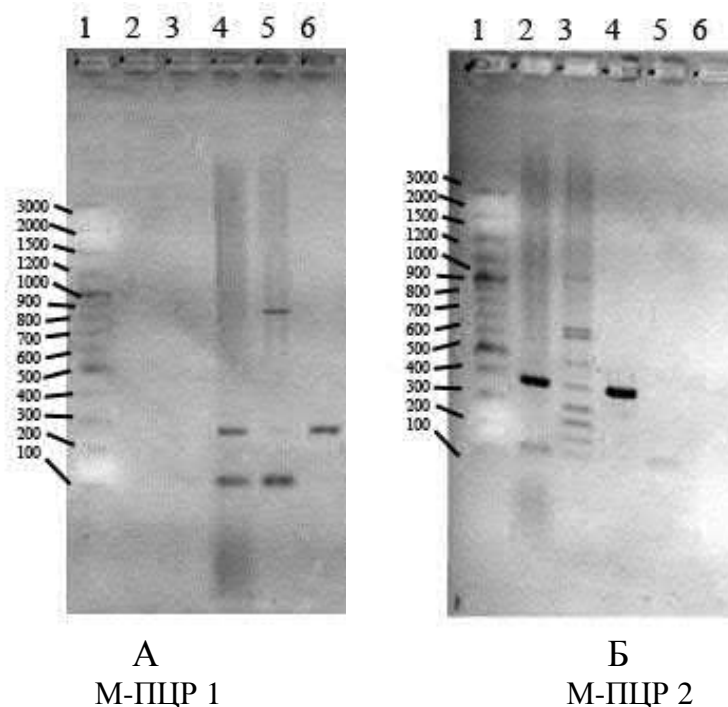


Рисунок 7 - Электрофореграмма результатов пробных М-ПЦР на матрице ДНК лактобацилл

Примечание:

(А) 1 – Маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 2 - *L. rhamnosus* 421-2, 3 - *L. delbrueckii* 19, 4 - *L. casei* КЗШ24, 5 - *L. helveticus* 100 аш, 6 - *L. fermentum* КР1; (Б) 1 - Маркер мол.веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 2 - *L. casei* КЗШ24, 3 - *L. helveticus* 100 аш, 4 - *L. fermentum* КР1, 5 - *L. delbrueckii* 19, 6 - *L. rhamnosus* 421-2

Из приведенного рисунка видно, что идентификация микроорганизмов осложнена неспецифическими ответами ПЦР, что, однако, не мешало правильно идентифицировать штаммы. На рисунке 7А дорожки 4, 5 и 6 имеют ампликоны, однако они являлись не специфичными и не совпадали с размерами ожидаемых фрагментов. Так в наборе М-ПЦР 1 (Рисунок 7А) проходила ПЦР с ДНК *L. casei* КЗШ24, давая два ампликона размером 110-120 и 260-280 п.н., а как видно в таблице 17, ожидаемые размеры составляли 133 и 295 п.н. соответственно. Кроме того, результаты М-ПЦР 2 (Рисунок 7Б) с тем же штаммом *L. casei* КЗШ24 также давали два ампликона размером 110-120 и 370-390 п.н., а как видно в таблице 17, ожидаемые размеры составляли 137 и 396 п.н. соответственно. Таким образом, штамм мог бы быть ложно идентифицирован, как *L. fermentum*, однако наличие неспецифического ампликона подчеркнуло, что требуется уточнение вида при постановке классической ПЦР с праймерами на *L. fermentum*. Неспецифического ампликона в случае истинного штамма *L. fermentum* не

наблюдалось (Рисунок 7Б, дорожка 4). Так же наблюдалось наличие только одного специфического ампликона в М-ПЦР 2 с ДНК *L. delbrueckii* 19.

Далее созданные мультиплексные ПЦР были перегруппированы и дополнены другими праймерами, специфичными к ДНК определенных видов лактобацилл, температуры плавления которых также были сходны и ожидаемый размер ампликона не повторялся. Кроме того, была выделена группа праймеров, специфичных к разным филогенетическим группам лактобацилл, гомологичных одновременно к нескольким видам лактобацилл, относящихся к одной филогенетической группе (Таблица 18, Рисунок 8).

Таблица 18 - Наборы праймеров для постановки мультиплексных ПЦР

М-ПЦР №1 (Тамп=53 ⁰ С)		М-ПЦР №2 (Тамп=52 ⁰ С)		М-ПЦР №3 (Тамп=52 ⁰ С)	
Праймеры	Ожид.р-р амп-на	Праймеры	Ожид.р-р амп-на	Праймеры	Ожид.р-р амп-на
<i>L.casei_group</i>	116	<i>L. rhamnosus</i>	121	<i>L.delbrueckii</i>	137
<i>L.delbrueckii_group</i>	279	<i>L. crispatus</i>	133	<i>L. fermentum</i>	396
<i>L.reuteri_group</i>	295	<i>L. helveticus</i>	345	<i>L. acidophilus</i>	600
<i>L.plantarum</i>	499	<i>L. ruminis</i>	502	<i>L.casei</i>	800

М-ПЦР №1 включает праймеры, специфичные к разным филогенетическим группам лактобацилл, гомологичные одновременно к нескольким видам лактобацилл, относящихся к одной филогенетической группе. Так, праймеры *L. casei_group* специфичны к ДНК *L. casei*, *L.paracasei*, *L.rhamnosus*; *L.delbrueckii_group* специфичны к *L.delbrueckii*, *L.acidophilus*, *L. helveticus*, *L.gasseri*, *L.johnsonii*; *L.reuteri_group* специфичны к *L.reuteri* и *L.fermentum*. Два других набора М-ПЦР №2 и М-ПЦР №3 включают праймеры специфичные строго к перечисленным в таблице 18 видам.



Рисунок 8 - Электрофореграмма результатов М-ПЦР №1, №2, №3 на матрице ДНК исследуемых бактерий

Примечание: 1 - маркер мол.веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 2 - *L.paracasei* Lactosan, 3 - *L.delbrueckii* TS1-06, 4 - *L.reuteri* 7-3, 5 - *L.plantarum* 8P-A3, 6 - маркер мол.веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 7 - *L. rhamnosus* K32, 8 - *L. crispatus* M1, 9 - *L. helveticus* Д75, 10 - *L. ruminis* 4-4, 11 - маркер мол.веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 12 - *L.delbrueckii* TS1-06, 13 - *L. fermentum* TS3-06, 14 - *L. acidophilus* Биобактон, 15 - *L.casei* ATCC 393

Результат применения разработанного метода определения вида лактобацилл на примере М-ПЦР №3 представлен на рисунке 9.

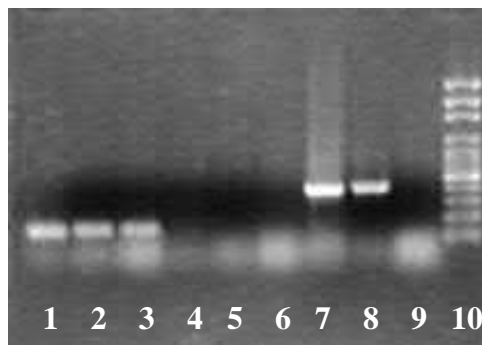


Рисунок 9 - Электрофореграмма результатов М-ПЦР №1 на матрице ДНК исследуемых бактерий

Примечание: 1 - *L. delbrueckii* TS1-06; 2 - *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1; 3 - *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2; 4 - *L. acidophilus* Д75; 5 - *L. acidophilus* Д76; 6 - *E. faecium* L3; 7 - *L. fermentum* TS3-06; 8 - *L. fermentum* 65; 9 – отрицательный контроль; 10 - Маркер молекулярного веса 100-1000, 1200, 1500, 2000 пн (100 bp DNA Ladder, Invitrogen)

Полученные результаты демонстрируют, что три из четырех исследуемых лактобацилл относятся к виду *L. delbrueckii* и один микроорганизм относится к виду *L. fermentum*. Полученный результат совпадает с данными, полученными в результате идентификации лактобацилл с помощью метода 16S рРНК типирования, и подтверждает достоверность разработанного метода идентификации лактобацилл с помощью М-ПЦР.

3.2. Исследование геномов исследуемых лактобацилл на наличие генов, кодирующих бактериоцины

Анализ литературных данных показал, что гомологи генов бактериоцинов, встречающиеся у одних видов лактобацилл, могут быть обнаружены и у других видов. При этом гомология последовательностей ДНК, кодирующих лактоцины, может достигать 100% [63, 108]. Способность синтезировать бактериоцины является важной характеристикой штаммов – кандидатов в пробиотики.

Пять исследуемых лактобацилл, выделенных из молочнокислых продуктов и препаратов, были проанализированы на наличие в их геномах генов, кодирующих белки-бактериоцины: лактоцинов S, F, B, 705, сакацинов P и A, плантарицинов A, S и EF. Для этого на матрице ДНК исследуемых штаммов лактобацилл была проведена ПЦР с использованием праймеров (Таблица 14), созданных на основе существующих в базах данных GenBank NCBI и Human Microbiota последовательностей ДНК, кодирующих гены известных бактериоцинов.

В результате проведенного исследования в геноме *L. plantarum* 8P-A3 были обнаружены гены, кодирующие феромон-плантарицин А и двухпептидный бактериоцин EF (Рисунок 10).



Рисунок 10 - Электрофореграмма результатов ПЦР на матрице хромосомной ДНК *L. plantarum* 8P-A3 с праймерами специфичными к генам плантарицинов

Примечание: 1 - Праймеры *plnEF*-спец; 2 - Праймеры *plnA*-спец; 3- отрицательный контроль; 4 - Маркер мол. веса 100-1000, 1500 пн (100bp DNA Ladder, Promega)

По данным литературы [68, 139] геном микроорганизма, кодирующего гены таких белков (*plnA*, *plnEF*), часто несет гены ряда белков, регулирующих транскрипцию и транспорт плантарицина EF. За это ответственен целый оперон размером около 10000 пар нуклеотидов, называемый консервативной частью плантарицинового локуса. С консервативной частью плантарицинового локуса сопряжена также и варибельная часть локуса, размером от 5000 до 12000 пар нуклеотидов. Вместе консервативная и варибельная части образуют плантарциновый локус размером от 15000 до 22000 пар нуклеотидов, кодирующий ряд генов белков-плантарицинов и гены вспомогательных белков.

Таким образом, положительный ответ ПЦР на матрице ДНК *L. plantarum* 8P-A3, выявивший в геноме штамма гены плантарцинов А и EF, позволил предположить, что в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3 также присутствуют гены, характерные для консервативной части плантарицинового локуса – гены регулятора ответа, гистидин киназы, транспортных и вспомогательных белков.

Анализ геномов четырех других лактобацилл на наличие генов, кодирующих белки-бактериоцины, не выявил генов, кодирующих перечисленные бактериоцины в геномах *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2. Необходимо отметить, что проведенный анализ включал поиск только нескольких бактериоцинов, для которых известны их нуклеотидные последовательности. Способность исследуемых штаммов избирательно подавлять рост патогенных микроорганизмов (что было показано в исследовании антагонистической активности) может говорить о наличии невыявленных генов новых антимикробных пептидов – бактериоцинов в геноме исследуемых лактобацилл.

3.3. Генетический анализ плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3

В зарубежной литературе было подробно описано несколько штаммов лактобацилл, имеющих плантарициновый локус (плн-локус) с различной генетической организацией [68, 139, 152, 154]. Плантарициновые локусы различных штаммов *L. plantarum* характеризуются наличием двух частей – консервативной и варибельной. Консервативная часть плн-локуса, сходная у всех штаммов, несущих локус, имеет размер около 11500 пар нуклеотидов. Варибельная часть плн-локуса, если присутствует, то может быть размером от 5000 до 9000 пар нуклеотидов. Различные типы плн-локусов кодируют три плантарицина: EF, JK, NC8 и ряд других белков, необходимых для регуляции транскрипции и транспорта плантарицинов.

Наличие в геноме *L. plantarum* 8P-A3 генов, кодирующих феромон-плантарицин А и двухпептидный бактериоцин EF, позволило предположить, что геном *L. plantarum* 8P-A3 несет трехкомпонентную регуляторную систему синтеза плантарицина EF, а также весь консервативный участок плн-локуса. Поэтому следующим этапом работы стал анализ организации плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3.

Для анализа организации плн-локуса в штамме *L. plantarum* 8P-A3 были составлены праймеры (Таблица 15), соответствующие известным нуклеотидным последовательностям штаммов *L. plantarum* J51, NC8, WCFS1.

Анализ плн-локуса *L. plantarum* 8P-A3 с помощью ПЦР (Рисунок 11) подтвердил наличие в консервативной части локуса трех оперонов: оперон *plnEFI*, кодирующий планарицин EF и белок устойчивости к нему; регуляторный оперон *plnABCD*, кодирующий два регулятора ответа (активатор и супрессор), гистидин киназу и белок активатор (феромон); транспортный оперон *plnGHSTUV*, кодирующий ABC-транспортёр, вспомогательный транспортный белок, а также ряд протеаз СААХ II семейства, функция которых на настоящий момент не определена. Было показано, что консервативная часть плн-локуса *L. plantarum* 8P-A3 имеет гомологию 99% с соответствующими последовательностями штаммов *L. plantarum* C11 и *L. plantarum* J51 (номера доступа GenBank NCBI - X94434 и DQ340868 соответственно).

Помимо консервативной части плн-локуса, в штаммах, обладающих данным генетическим комплексом, часто обнаруживают и область гетерогенности, индивидуальную для каждого штамма *L. plantarum*. Набор Flash High-Fidelity PCR Master mix (Finnzymes, Финляндия) позволил получить фрагмент ДНК размером около 20 тыс. п.н. в результате ПЦР с праймерами парА1 – plnU (Рисунок 11, дорожка 10). Этот результат свидетельствовал о том, что в штамме *L. plantarum* 8P-A3 имеется варибельная часть плн-локуса, по размерам она соизмерима с таковыми уже исследованных штаммов.



Рисунок 11 - Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3

Примечание: 1- *plnR* – *plnJ*, 2- *plnB*– *plnC*, 3- *plnH*– *plnU*, 4- *plnI*– *plnE*, 5- *plnI*– *plnG*, 6- *plnC* – *plnF*, 7- *napA1* – *plnA*, 8-*plnR* – *plnA*, 9-*plnR* – *plnC*, 10- *napA1* – *plnU*, 11-Маркер молекулярного веса 100-1000, 1500 пн (100bp DNA Ladder, Promega), 12- ДНК фага λ , рестрицированная *EcoRI* (Thermo Scientific), 13- Маркер молекулярного веса 300-10000 пн (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific)

Для анализа организации варибельного участка плн-локуса в штамме *L. plantarum* 8P-A3 была проведена ПЦР с праймерами, гомологичными генам, встречающимся в различных по организации плн-локусах (Таблица 15). Анализ варибельной части выявил, что локус несет оперон *plnNC8 β ac*, кодирующий двухпептидный бактериоцин NC8 и белок устойчивости к нему; участок, кодирующий три открытые рамки считывания *orf3*, *orf4* и *orf5*, которые были ранее описаны в штамме *L. plantarum* J51 [139]. Также было показано, что локус кодирует неполный оперон *plnJKLR* (отсутствуют гены *plnJ* и *plnK*).

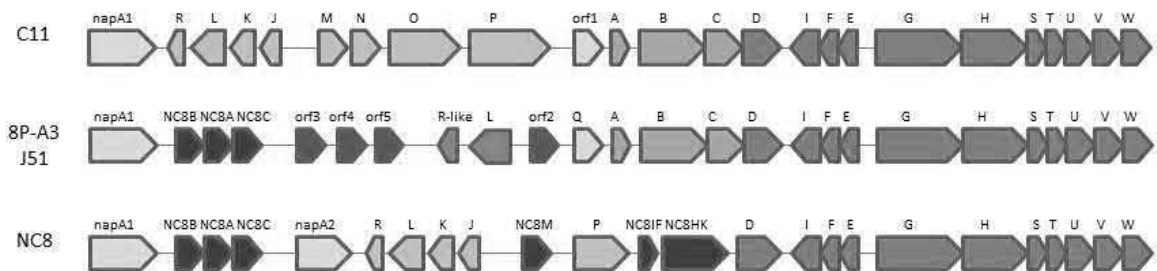


Рисунок 12 - Схема организации плн-локуса *L. plantarum* 8P-A3 в сравнении с другими штаммами *L. plantarum*

На рисунке 12 приведена схема организации плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3 в сравнении с организацией плн-локусов других штаммов *L. plantarum*. Анализ полученных результатов выявил сходство в строении плн-локуса *L. plantarum* 8P-A3 и *L. plantarum* J51.

В результате проделанной работы впервые было показано наличие плантарицинового локуса, кодирующего два двухпептидных бактериоцина в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3. Был проведен анализ генетической организации плантарицинового локуса штамма *L. plantarum*

8P-A3. Было показано сходство организации локуса со штаммом *L. plantarum* J51. Локус *L. plantarum* 8P-A3 был полностью просеквенирован и депонирован в банк данных GenBank NCBI, ему присвоен идентификационный номер HQ651181.

3.4. Полногеномное секвенирование *L. plantarum* 8P-A3

С помощью полногеномного секвенирования штамма *L. plantarum* 8P-A3 было установлено, что геном штамма имеет одну хромосому (3323296 п.н.) и одну плазмиду (9480 п.н.). Всего геном кодирует 3174 гена, из них 3005 генов кодируют белки, 78 генов отвечают за синтез тРНК и 16 генов - рРНК. Идентификационные номера нуклеотидных последовательностей в банке данных GenBank NCBI CP046726; CP046727.

Полногеномное секвенирование *L. plantarum* 8P-A3 подтвердило, что плантарициновый локус, просеквенированный нами ранее, располагается на хромосоме. Штамм не несет других генов, кодирующих бактериоцины, кроме расположенных на плантарициновом локусе плантарицинов А, EF и NC8 (Глава 3, п.3.3). В геноме штамма обнаружен ген устойчивости к микроцину C7; 13 копий гена, кодирующего алкогольдегидрогеназу; 6 копий гена, кодирующего лактатдегидрогеназу. Сравнение полногеномного сиквенса штамма *L. plantarum* 8P-A3 и ранее просеквенированного плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3 показало 99,9% сходство между последовательностями (Рисунок 13). Полученный результат подтверждает ранее полученные результаты о строении плантарицинового локуса штамма *L. plantarum* 8P-A3.

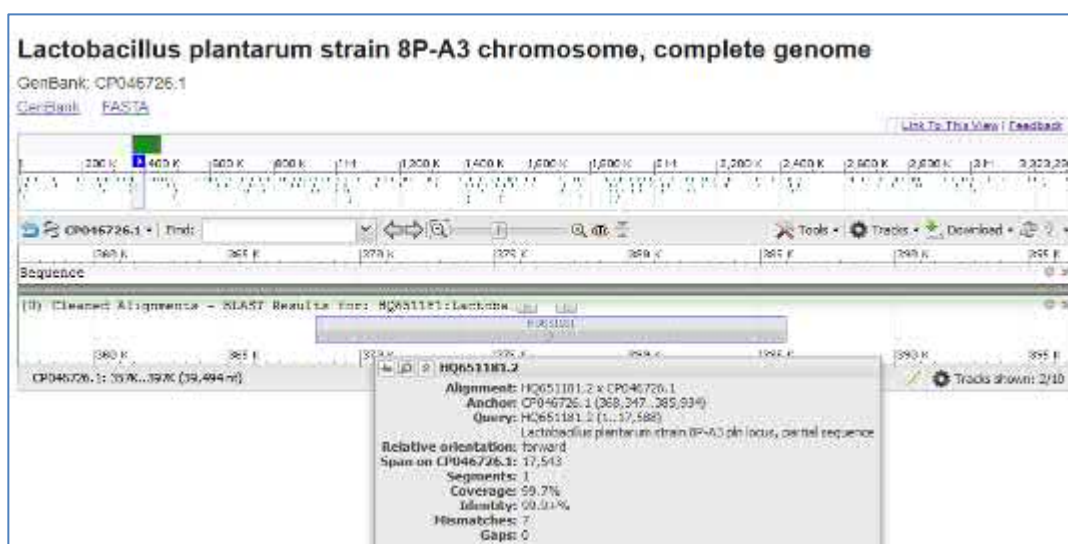


Рисунок 13 – Сравнение полногеномного сиквенса штамма *L. plantarum* 8P-A3 и ранее просеквенированного плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ ИССЛЕДУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОССТАНАВЛИВАТЬ МИКРОБНЫЙ БАЛАНС ПОСЛЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ДИСБИОЗА НА МОДЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для изучения влияния молочнокислых микроорганизмов на макроорганизм и его микрофлору при развитии дисбиотических состояний была использована модель дисбиоза кишечника, разработанная д.м.н. Ермоленко Е.И. [17].

После индукции дисбиоза антибиотиками крысам вводили молочнокислые закваски на основе исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов. Первой группе крыс, обозначенной «группа *L. plantarum* 8P-A3», вводили молоко, заквашенное штаммом *L. plantarum* 8P-A3. Крысам «группа DF-молоко» вводили молоко, заквашенное штаммами *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06. Крысам «группа *E. faecium* L3» вводили молоко, заквашенное штаммом *E. faecium* L3. Контрольной группе животных после воздействия антибиотиками вводили молоко.

После трехдневной антибиотикотерапии в фекалиях крыс достоверно снизилось количество лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, и выросло количество протеев, кишечной палочки и клебсиелл. Изменение количественного состава микрофлоры толстой кишки крыс после антибиотикотерапии представлены на рисунке 14.

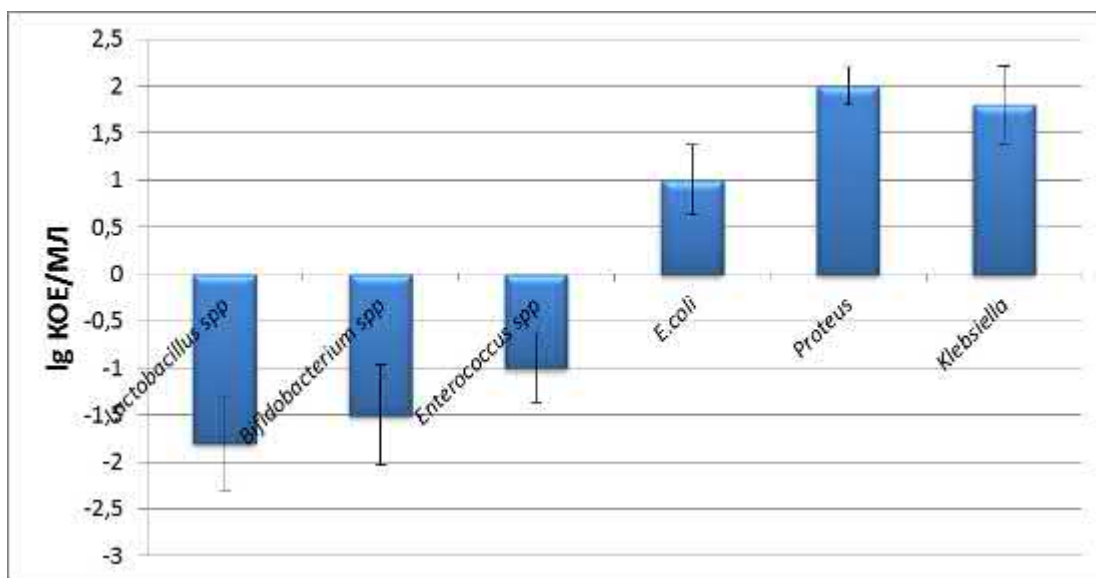


Рисунок 14 - Изменение количественного состава микрофлоры толстой кишки после антибиотикотерапии

В течение всего эксперимента ежедневно оценивалось изменение аппетита и веса крыс. Для оценки аппетита крыс оценивалось количество корма, съеденного одним животным за одни сутки. Для этого ежедневно в 10 часов утра проводили замену корма новой порцией (200 г) и проводили взвешивание корма, не съеденного животными за последние сутки. Затем вес

оставшегося корма вычитали из положенных 200 г и делили на количество животных. На рисунках 15 и 16 представлена динамика аппетита и веса исследуемых групп животных.

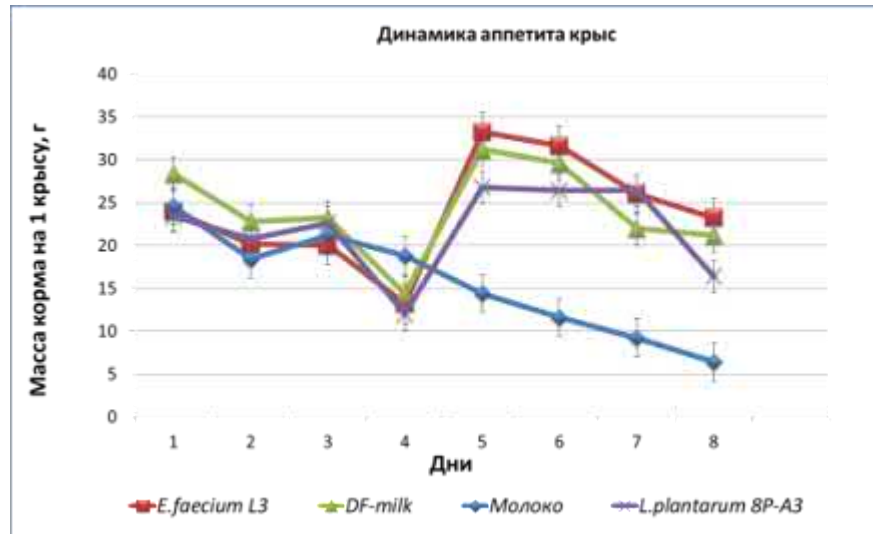


Рисунок 15 - Изменение аппетита крыс в течение эксперимента

Аппетит животных снижался в течение первых четырех дней эксперимента. Первые три дня крысам вводили антибиотики, и снижение аппетита может объясняться плохим самочувствием животных. На четвертый день, когда вводили первую порцию молочнокислой закваски, также наблюдалось снижение аппетита. Однако начиная с пятого дня (второй день введения молочнокислой закваски) у всех групп крыс, за исключением контрольной, получавшей молоко, наблюдается повышение аппетита. Таким образом, можно заключить, что введение молочнокислой закваски имеет не мгновенный эффект и требует затрат времени, чтобы оказать положительное воздействие на организм животного.

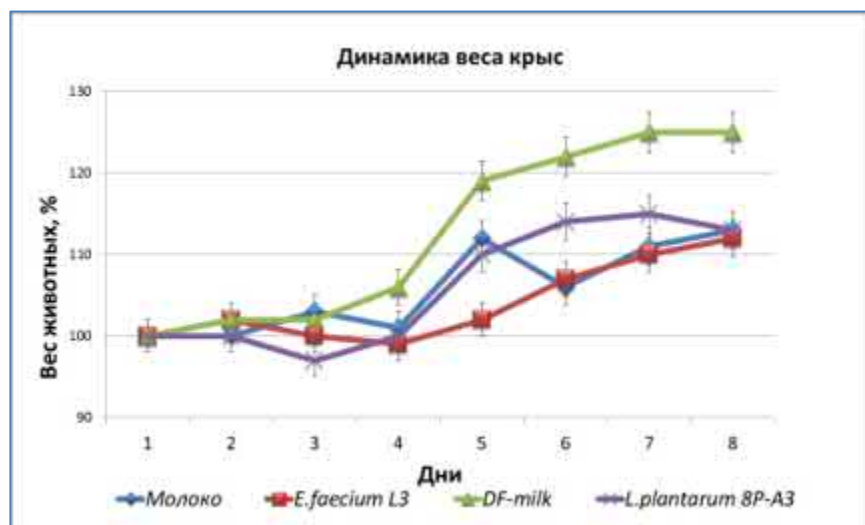


Рисунок 16 - Изменение веса крыс в течение эксперимента

Вес крыс в первый три дня эксперимента (введение антибиотиков) практически не менялся или снижался (группа *L. plantarum* 8P-A3). И аналогично динамике изменения

аппетита, на четвертые сутки положительных изменений в весе животных не наблюдалось, за исключением группы, получавшей DF-молоко.

Из обоих приведенных рисунков видно, что аппетит и вес начинали расти в тех группах, крысам которых после антибиотиков дополнительно к стандартному рациону вводили молочнокислые закваски. Очевидно снижение аппетита у животных контрольной группы в течение всего эксперимента. Увеличение массы тела крыс контрольной группы происходило наравне с группами, получавшими молочнокислые закваски на основе *E. faecium* L3 и *L.plantarum* 8P-A3.

Изменения количественного состава микрофлоры толстой кишки крыс после пятидневной терапии молочнокислыми заквасками представлены на рисунке 17.

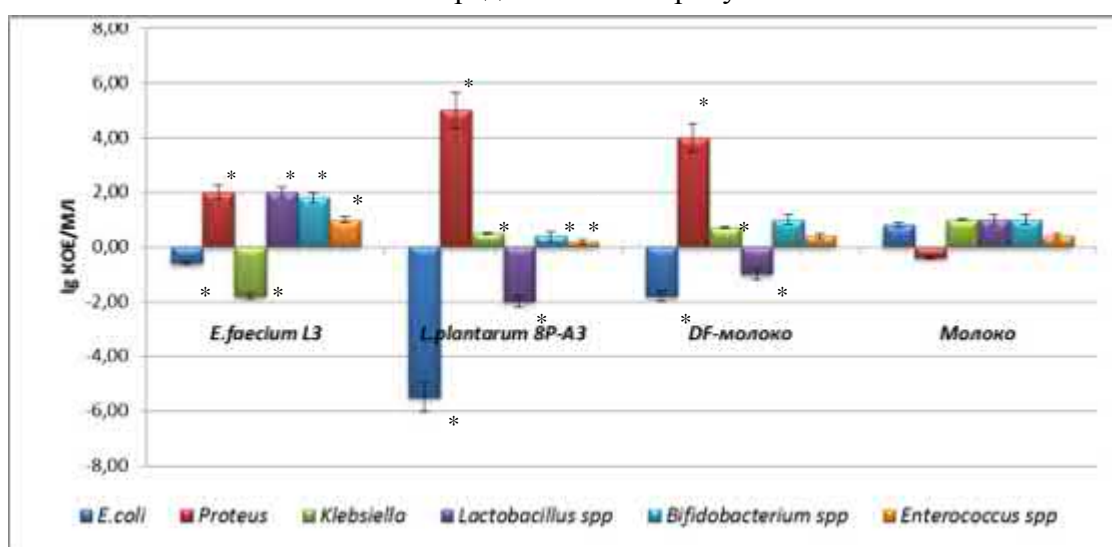


Рисунок 17 - Изменение количественного состава микрофлоры толстой кишки исследуемых групп животных после введения молочнокислых заквасок

Примечание: *при сравнении с контролем $p < 0,05$

После пятидневной терапии молочнокислыми заквасками в фекалиях всех групп крыс, кроме контрольной, достоверно снизилось количество энтеропатогенной кишечной палочки. Количество протей увеличилось во всех группах, кроме контрольной. В группе, получавшей *L.plantarum* 8P-A3, снизилось количество лактобацилл. Необходимо отметить обратную связь в соотношении количества протей и лактобацилл в фекалиях крыс после пробиотикотерапии. По результатам данного эксперимента, *L. plantarum* 8P-A3 был способен подавлять рост кишечной палочки, снизив ее содержание в фекалиях крыс на 5 порядков. Но, кроме этого, штамм угнетал рост лактобацилл вероятно за счет способности продуцировать антимикробные вещества, к которым у других представителей микробиоты крыс имеется устойчивость. Такой результат показывает, что на фоне терапии пробиотиками, обладающими такими сильными антимикробными свойствами, может возникать состояние, близкое к состоянию дисбиоза, к которому неизменно приводит терапия антибиотиками. Таким образом, на фоне приема

пробиотика-сильного антагониста может происходить подавление роста широко спектра микроорганизмов и на фоне этого происходит подрост микроорганизмов, не чувствительных к действию штамма-пробиотика. Подобный результат наблюдается и в другой группе крыс, получавших в качестве пробиотической терапии молочнокислую закваску на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06. Такой результат может объясняться тем, что эти штаммы микроорганизмов не способны подавлять рост протей, но способны подавлять рост близкородственных видов – лактобацилл.

Наилучший результат по способности восстанавливать микробный баланс после индуцированного дисбиоза показали закваски, на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 (DF-молоко) и на основе штамма *E. faecium* L3. В то время как аппетит у всех групп животных, кроме контрольной, достоверно вырос после введения в рацион молочнокислых заквасок, наиболее быстрое увеличение веса наблюдалось у крыс «группа DF-молоко». Кроме того, по окончании эксперимента было проведено вскрытие животных. Наблюдались характерные изменения кишечника у крыс контрольной группы и группы, получавшей закваску на основе *L. plantarum* 8P-A3. Изменения кишечника выражались в изменении цвета кишечника к более темному, вздутии отдельных частей кишечника, неравномерном распределении содержимого кишечника, вызывавшем в некоторых частях увеличение диаметра кишечника в 2 раза. Кишечники крыс, получавших после антибиотикотерапии закваску DF-молоко на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 и закваску на основе *E. faecium* L3 выглядели также как у контрольных здоровых крыс, не получавших антибиотики.

На основании исследований функционального потенциала, пробиотических свойств и исследований на модели лабораторных животных штаммы *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06, выделенные из домашнего таджикского молочнокислого продукта «Чакка», были отобраны как наиболее перспективные для практического применения и запатентованы (патент РФ на изобретение № 2391395 от 10.06.2010, патент РФ на изобретение № 2391393 от 10.06.2010).

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДА И ПОЛУЧЕНИЕ АУТОПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ СОБСТВЕННЫХ ШТАММОВ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА

5.1. Выделение индигенных штаммов молочнокислых микроорганизмов

Индигенные штаммы молочнокислых микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Enterococcus* выделяли из материала, полученного от пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Для этого осуществляли забор материала из толстой кишки пациента (кал/ректальный мазок). Забор материала проводился сотрудниками Городской больницы №26 Санкт-Петербурга. В исследование вошли 84 пациента с СРК. Из них 16 пациентов входили в группу по получению индигенных лактобацилл и 25 пациентов входили в группу по получению индигенных энтерококков. Тампон с материалом помещали в 5 мл транспортной среды (физиологический раствор хлорида натрия с добавлением фосфатов натрия двух и однозамещенных, рН 7,4) и доставляли в бактериологическую лабораторию ФГБНУ «ИЭМ» не позднее 2 часов после забора материала. В стерильных условиях к 1 мл суспензии добавляли 9 мл стерильного физиологического раствора, перемешивали на вортексе и высевали в количестве 100 мкл на плотную селективную питательную среду. Для выделения индигенных лактобацилл использовали среду МРС-4, для выделения индигенных энтерококков использовали Энтероккагар. Засеянные чашки инкубировали в течение 24-48 часов при 37⁰С в анаэробных или микроаэрофильных условиях. Отбор отдельных колоний целевых микроорганизмов (*Lactobacillus spp./ E. faecium*) осуществляли на основании морфологических свойств колоний и клеток изолированных микроорганизмов. Отдельные колонии пересеивали стерильной одноразовой петлей на соответствующую плотную селективную питательную среду, и остаток материала использовали для приготовления фиксированного мазка для окраски по Граму и оценки морфологических свойств клеток микроорганизмов. Для микроскопии окрашенных мазков использовали оптический микроскоп МИКМЕД-6 (ОАО «ЛОМО», Россия), увеличение в 1000 раз. Вновь засеянные Чашки Петри инкубировали в течение 24-48 часов при 37⁰С в анаэробных или микроаэрофильных условиях. Далее на основании морфологических свойств колоний и клеток производили отбор типичных для *Lactobacillus spp./ E. faecium* культур. Для дальнейшего анализа использовали грамположительные палочки в виде цепочек или отдельных клеток (предположительно лактобациллы) или слегка вытянутые кокки в цепочках (предположительно энтерококки). Чистые культуры наиболее перспективных штаммов направляли на генетический анализ.

На данном этапе от каждого пациента было получено от 1 до 3 перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов. Таким образом, было получено 16 штаммов индигенных лактобацилл и 40 штаммов индигенных энтерококков. К перспективным штаммам относили

грамположительные клетки, растущие на соответствующих селективных средах, способные заквашивать молоко. Чистые культуры штаммов подвергали криоконсервации и проводили их генетическую идентификацию.

5.2. Идентификация индигенных молочнокислых микроорганизмов

Генетический анализ выделенных штаммов молочнокислых микроорганизмов включал определение рода и вида чистой культуры, а также анализ наличия в геноме изолированных штаммов наиболее распространенных потенциальных генов патогенности методом ПЦР. Праймеры, использованные для определения рода и вида исследуемых микроорганизмов, приведены в таблице 3 и 17. Для дальнейшего использования отбирали те штаммы микроорганизмов, которые были идентифицированы до вида. По определению ВОЗ лактобациллы являются безопасными для организма человека (маркированы как GRAS) [93, 197]. Поэтому, в случае получения аутопробиотического молочнокислого продукта на основе лактобацилл, после генетической идентификации до вида штаммы лактобацилл использовались для приготовления готового продукта аутопробиотика.

Для получения аутопробиотического молочнокислого продукта на основе энтерококков отбирали штаммы вида *E. faecium*. После генетической идентификации все индигенные штаммы *E. faecium* анализировали на наличие в их геноме генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности: устойчивость к ванкомицину (ген *van*), адгезины (гены *asa1*, *esp*), желатиназу (ген *gelE*), белок феромон (ген *fsrB*), сериновую протеазу (ген *sprE*). Праймеры, использованные для детекции генов патогенности энтерококков, приведены в таблице 3. Для получения готового продукта аутопробиотика использовали штаммы, относящиеся к виду *E. faecium*, не содержащие ни одного из перечисленных генов патогенности.

Генетическую идентификацию всех изолированных индигенных лактобацилл проводили с помощью разработанного нами метода определения вида лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР. Для этого на матрице ДНК, выделенной из чистой культуры штамма индигенной лактобациллы, проводили три мультиплексные ПЦР: М-ПЦР №1 - №3 и затем производили анализ полученных результатов.

Для иллюстрации использования предлагаемого метода идентификации лактобацилл на рисунке 18 приведены результаты М-ПЦР с набором праймеров М-ПЦР №2 (Таблица 18) на матрице ДНК микроорганизмов (предположительно лактобацилл), выделенных от пациентов и направленных на генетический анализ с целью определения рода и вида.

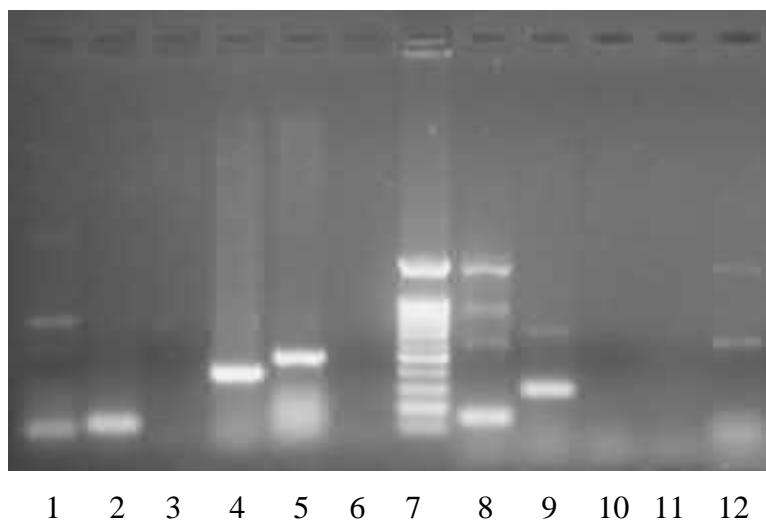


Рисунок 18 - Электрофореграмма результатов М-ПЦР №2 на матрице ДНК микроорганизмов, выделенных от пациентов с СРК

Примечание: 1 - *L. rhamnosus* K32 (+ контроль); 2 - *L. crispatus* M1; 3 - отрицательный контроль; 4 - *L. helveticus* Д75; 5 - *L. ruminis* ПСРК3; 6 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 19; 7 - Маркер мол. веса 100-1000, 1500 пн (100bp DNA Ladder, Promega); 8 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 22; 9 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 23; 10 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 25; 11 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 26; 12 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента, обозначенного СРК 27

Из приведенного рисунка видно, что штаммы микроорганизмов, полученных от пациентов, обозначенных СРК 19, 25, 26, 27 не относятся ни к одному из видов лактобацилл, праймеры на которые представлены в М-ПЦР №2. Микроорганизм, изолированный от пациента, обозначенного СРК 22, относится к виду *L. crispatus*. Положительный ответ ПЦР, наблюдаемый на дорожке 9 рисунка 18, имеет размер ампликона около 300 пар нуклеотидов, что является неспецифичным для данной реакции. Соответственно штамм микроорганизма от пациента, обозначенного СРК 23, также не относится ни к одному из видов лактобацилл, праймеры на которые представлены в М-ПЦР №2.

Все штаммы микроорганизмов, изолированные от пациентов, были проанализированы с помощью М-ПЦР №1 - №3. В результате генетической идентификации лактобацилл с помощью М-ПЦР было отобрано 16 штаммов индигенных лактобацилл от 16 пациентов с синдромом раздраженного кишечника (Таблица 19). Далее штаммы были использованы для получения аутопробиотической молочнокислой закваски и дальнейших исследований.

Таблица 19 - Результаты генетического анализа штаммов лактобацилл, выделенных от пациентов с СРК (штаммы, использованные для приготовления аутопробиотика)

Номер образца	Род и вид изолированных культур
СРК 4, СРК 8	<i>L. helveticus</i>
СРК 7, СРК 10, СРК 23	<i>L. fermentum</i>
СРК 11, СРК 25, СРК 26, СРК 27	<i>L. plantarum</i>
СРК 13, СРК 16, СРК 17, СРК 19	<i>L. delbrueckii</i>
СРК 22, СРК 32	<i>L. crispatus</i>
СРК 31	<i>L. reuteri</i>

Для генетической идентификации штаммов индигенных энтерококков использовали классическую ПЦР с праймерами, гомологичными участку ДНК, кодирующему специфическую ДНК геликазу *E. faecium*. Для создания аутопробиотического молочнокислого продукта на основе штаммов энтерококков использовали только штаммы вида *E. faecium*. В качестве положительного контроля ПЦР использовали ДНК пробиотического штамма *E. faecium* L3.

После получения чистых культур грамположительных кокков на плотной питательной среде Энтерокагар из клеток выделяли ДНК и на ее матрице проводили ПЦР с праймерами, гомологичными ДНК микроорганизма вида *E. faecium*. Результаты ПЦР на матрице ДНК некоторых индигенных штаммов с праймерами, специфичными к ДНК микроорганизма вида *E. faecium* представлены на рисунке 19.

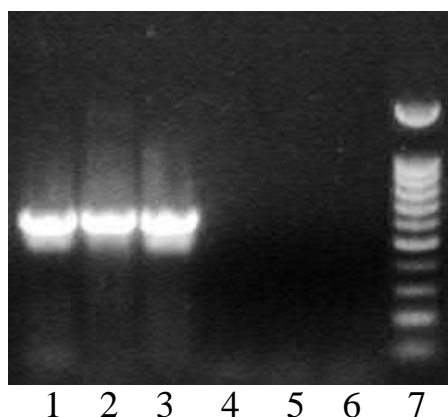


Рисунок 19 - Электрофореграмма результатов ПЦР на матрице ДНК микроорганизмов, выделенных от пациентов с СРК и ДНК *E. faecium* L3 с *E. faecium*-специфичными праймерами. *Примечание:* 1 - *E. faecium* L3 (+ контроль); 2 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 60; 3 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 61; 4 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 62; 5 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 63; 6 - ДНК микроорганизма, полученного от пациента СРК 64; 7 - Маркер мол. веса 100-1000, 1500 пн (100bp DNA Ladder, Promega)

Из приведенного рисунка видно, что ПЦР с праймерами, специфичными к ДНК *E. faecium* на матрице ДНК микроорганизмов, выделенных от пациентов с СРК, дала положительный

результат для двух из пяти штаммов с образованием ожидаемого размера фрагмента. Таким образом, можно сделать вывод о том, что штаммы от пациентов СРК 60, 61 относятся к виду *E. faecium*. Для дальнейшего исследования отбирали штаммы, идентифицированные в результате ПЦР как *E. faecium*. Таким образом, на данном этапе было отобрано 25 штаммов *E. faecium*. Все штаммы, выделенные от пациентов с СРК, относящиеся к виду *E. faecium* далее направлялись для генетического анализа на наличие в их геноме генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности.

5.3. Исследование геномов исследуемых энтерококков на наличие генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности

Для создания на основе штаммов *E. faecium*, выделенных от пациентов с СРК, аутопробиотической молочнокислой закваски, использовали штаммы, не содержащие ни один из генов, кодирующих потенциальные детерминанты патогенности. Для этого на матрице ДНК всех штаммов, изолированных от пациентов, проводили ПЦР с праймерами, специфичными к участкам ДНК, кодирующим потенциальные факторы вирулетности энтерококков (Таблица 3). Результаты анализа некоторых индигенных штаммов *E. faecium* представлены на рисунке 20.



Рисунок 20 - Электрофореграмма результатов ПЦР на матрице ДНК микроорганизмов, выделенных от пациентов с СРК с праймерами на гены патогенности

Примечание: 1 - *E. faecium* СРК 55, праймеры на вид *E. faecium* (+); 2 - *E. faecium* СРК 56, праймеры на вид *E. faecium* (-); 3 - *E. faecium* СРК 55, праймеры на ген *esp* (+); 4 - *E. faecium* СРК 56, праймеры на ген *esp* (-); 5 - *E. faecium* СРК 51, праймеры на ген *sprE* (-); 6 - *E. faecium* СРК 52, праймеры на ген *sprE* (+); 7 - *E. faecium* СРК 53, праймеры на ген *sprE* (-); 8 - *E. faecium* СРК 54, праймеры на ген *sprE* (+); 9 - Маркер молекулярного веса 100-1000, 1500 пн (100bp DNA Ladder, Promega); 10 - *E. faecium* СРК 55, праймеры на ген *gelE* (-); 11 - *E. faecium* СРК 56, праймеры на ген *gelE* (+); 12 - *E. faecium* СРК 55, праймеры на ген *fsrB* (-); 13 - *E. faecium* СРК 56, праймеры на ген *fsrB* (+); 14 - *E. faecium* СРК 55, праймеры на ген *sprE* (-); 15 - *E. faecium* СРК 56, праймеры на ген *sprE* (+); 16,17 - *E. faecium* СРК 57, 58 праймеры на ген *sprE* (-); 18 - *E. faecium* СРК 55, праймеры на ген *efaA* (-); 19 - *E. faecium* СРК 56, праймеры на ген *efaA* (+); 20 - *E. faecium* СРК 55, праймеры на ген *asa* (-); 21 - *E. faecium* СРК 56, праймеры на ген *asa* (+); 22 - Маркер молекулярного веса 100-1000, 1500 пн (100bp DNA Ladder, Promega)

По результатам приведенного примера, микроорганизмы, изолированные от пациентов СРК 52, 54, 55, 56 были исключены из дальнейших исследований по созданию аутопробиотической молочнокислой закваски, так как содержали гены патогенности в своем геноме. Штаммы *E. faecium* СРК 51, 53, 57, 58 не содержали в своем геноме гена *sprE*, кодирующего сериновую протеиназу, а по результатам предыдущих исследований было установлено, что и других детерминант патогенности эти штаммы не содержат. Потому эти четыре штамма, а также еще двадцать один штамм, не содержащих в своем геноме генов патогенности, были использованы для создания аутопробиотической молочнокислой закваски для использования в дальнейших исследованиях.

5.4. Получение готового продукта аутопробиотика в виде молочнокислой закваски

После проведения всех исследований по выделению, идентификации и оценке безопасности индигенных штаммов молочнокислых микроорганизмов для получения аутопробиотиков были отобраны 16 штаммов *Lactobacillus sp.* и 25 штаммов *E. faecium* от 41 различных пациентов с СРК. Для получения готового продукта отдельную колонию чистой культуры засеивали в стерильное молоко (10 мл) с содержанием 7% глюкозы. Инкубировали при 37⁰С в течение 24-48 часов. Далее отбирали штаммы микроорганизмов с более быстрым ростом культуры, определяя это по образованию сгустка в молоке. Полученный сгусток переносили в 50 мл стерильного молока с содержанием 7% глюкозы. Инкубировали при 37⁰С 24-48 часов. Полученным посевным материалом засеивали 1 л стерильного молока. Инкубировали при 37⁰С 24-48 часов. Готовый продукт аутопробиотик проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры, высевая 100 мкл продукта на чашку Петри с колумбийским кровяным агаром (Conda, Испания). После получения молочнокислой закваски продукт хранили до использования при 4⁰С не более 4 дней. Аутопробиотические молочнокислые закваски использовали в дальнейших исследованиях. Разработанный метод получения аутопробиотиков на основе молочнокислых микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*, а также примеры использования разработанного метода подробно описаны (патент РФ на изобретение № 2460778 от 10.09.2012; патент РФ на изобретение № 2546253 от 10.04.2015; патент РФ на изобретение № 2553372 от 10.06.2015).

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОБИОТИКОВ И АУТОПРОБИОТИКОВ НА САМОЧУВСТВИЕ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

Исследования влияния аутопробиотиков, полученных с использованием метода, описанного в Главе 5, проводились сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга. В исследованиях принимали участие 84 пациента с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Все пациенты были разбиты на 4 группы. Две группы пациентов принимали аутопробиотические молочнокислые закваски и две группы принимали молочнокислые закваски на основе пробиотических штаммов микроорганизмов. Пациенты перорально получали молочнокислую закваску по 50 мл 2 раза в сутки в течение 10 дней. Далее проводили сравнительную клиническую оценку влияния терапии пробиотическими продуктами, содержащими аутоштаммы (*Lactobacillus spp.* / *E. faecium*) или исследуемые пробиотические штаммы *L.delbrueckii* TS1-06 и *L.fermentum* TS3-06 или *E. faecium* L3.

Клиническую оценку влияния пробиотической терапии на состояние пациентов с СРК проводили на основании динамики выраженности таких характерных для СРК симптомов, как выраженность боли в животе, дискомфорт в эпигастральной области, метеоризма, характеристика стула по Бристольской шкале (БШ). Так же оценивали сохранность аппетита и общее самочувствие по оценке пациента. Общее самочувствие пациентов оценивали полуколичественным методом, где 0 – хорошее, 1 – удовлетворительное, 2 – плохое, 3 – очень плохое самочувствие. Результаты клинической оценки пациентов до и после пробиотической терапии представлены в таблицах 20 и 21.

Таблица 20 - Динамика клинических показателей пациентов двух групп, принимавших молочнокислую закваску на основе штаммов *E. faecium*

Клинические показатели	<i>E. faecium</i> L3		Аутопробиотик на основе <i>E. faecium</i>	
	до лечения	после лечения*	до лечения	после лечения*
Боль в животе	1,62±0,16	0,87±0,15	1,75±0,17	0,41±0,15
Чувство тяжести	1,29±0,24	0,79±1,17	1,87±1,13	0,37±1,14
Метеоризм	2,33±0,11	1,33±0,17	2,45±0,12	0,62±0,16
Аппетит	1,04±0,04	1,37±0,10	1,00±0,00	1,70±0,09
Стул БШ	2,87±0,40	3,20±0,26	3,16±0,41	3,83±0,14
Самочувствие	1,83±0,14	0,16±0,18	1,95±0,16	0,66±0,14

Примечание: * до и после лечения в обеих группах $p < 0,01$, ** между группами $p > 0,2$

Таблица 21 - Динамика клинических показателей пациентов двух групп, принимавших молочнокислую закваску на основе штаммов *Lactobacillus spp.*

Клинические показатели	<i>L.delbrueckii</i> TS1-06 <i>L.fermentum</i> TS3-06		Аутопробиотик на основе <i>Lactobacillus spp.</i>	
	до лечения	после лечения*	до лечения	после лечения*
Боль в животе	2,09±0,30	0,91±0,70	1,89±0,93	1,00±0,87
Частота стула	2,41±1,02	1,57±0,99	2,61±1,32	1,33±0,83
Метеоризм	2,64±0,50	2,00±0,45	2,54±0,73	0,89±0,60
Аппетит	1,04±0,04	1,37±0,10	1,00±0,00	1,70±0,09
Стул БШ	5,40±1,09	4,00±1,00	5,67±1,41	3,11±0,78
Самочувствие	1,82±0,40	2,36±0,67	1,89±0,33	2,62±0,44

Примечание: * до и после лечения в обеих группах $p < 0,01$, ** между группами $p > 0,2$

Сравнительный анализ динамики клинических показателей выявил достоверное снижение основных болевых симптомов СРК у всех пациентов в четырех исследуемых группах. Все исследуемые пробиотические препараты, и на основе штаммов молочнокислых микроорганизмов, изолированных из молочнокислой закваски «Чакка» и препарата «Ламинолакт», а также на основе собственных штаммов микробиоты человека, оказались эффективны для снижения выраженности основных клинических проявлений страдания.

Во всех группах обследуемых пациентов, получавших молочнокислые закваски на основе собственных и пробиотических штаммов молочнокислых микроорганизмов, достоверно уменьшилась выраженность болевого синдрома, выраженность метеоризма, отмечено достоверное изменение формы стула. Наблюдалось достоверное улучшение общего самочувствия пациентов. Побочных эффектов обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микробиота играет важнейшую роль в нормальном функционировании и поддержании здоровья организма человека. Значимость микробиоты человека для его здоровья на настоящий момент является неоспоримым фактом, подтвержденным множеством научных исследований [52, 72, 89]. Поддержание микробного гомеостаза, видового разнообразия, нормального функционирования микробиоты человека является актуальной задачей современной биологии и медицины. Благодаря широкому спектру исследований, направленных на изучение действия некоторых препаратов-пробиотиков, была продемонстрирована эффективность пробиотических микроорганизмов для лечения различных заболеваний и состояний [65, 71, 81, 92]. Однако не только лечение, но и профилактика заболеваний, в основе которых лежат нарушения кишечного гомеостаза, является важнейшей проблемой современной медицины, а, в частности, той ее области, которая направлена на продление и улучшение качества жизни человека. Одна из последних публикаций в области изучения молочнокислых микроорганизмов называется «Пробиотические бактерии вызывают «сияние здоровьем» [124]. В работе авторы приводят результаты эксперимента по кормлению пробиотическими культурами пожилых особей мышей, в результате чего у животных, получавших пробиотики, происходит более быстрое заживление ран, шерсть блестит, и животные становятся более подвижными. Таким образом, актуальным остается постулат И.И. Мечникова о введении в обиход молочнокислых микробов, мешающих «загниванию в кишках» и обеспечивающих, таким образом, продление жизни [25].

Различные молочнокислые закваски являются частью культуры потребления пищи в странах мира. Следуя наблюдению И.И. Мечникова о том, что жители Болгарии, регулярно употребляющие кислое молоко, отличаются большей продолжительностью жизни, чем жители других европейских стран [24], в данной работе были проанализированы молочнокислые продукты, полученные из Армении и Таджикистана. Оба продукта – «Мацони» и «Чакка», получают в домашних условиях путем внесения заквашенного молока в новую порцию свежего молока. Эти продукты никогда не проходили контроль качества, стандартизацию, оценку эффективности или безопасности. Таким образом, изучение микробиологического состава продуктов и характеристика входящих в его состав штаммов в качестве потенциальных пробиотиков является актуальной задачей. Более того, «мода» на здоровый образ жизни и правильное питание, распространенные в развитых странах, обращает внимание, как исследователей, так и деятелей пищевой промышленности, на поиск новых продуктов, способных улучшить качество жизни, поддерживая здоровье людей. Важным аспектом новейших методов диагностики и лечения пациентов является индивидуальный подход. Так, расшифровка генома пациента, позволяет предсказать склонность к тем или иным

заболеваниям и, таким образом, предпринять меры профилактики. В данной работе в качестве персонализированного подхода к лечению заболеваний, связанных с ЖКТ человека, явилась разработка метода получения индивидуального пробиотического препарата на основе собственных штаммов лактобацилл и энтерококков, представителей нормальной микробиоты человека.

Целью представленной работы явилась характеристика биологических свойств штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из различных источников в качестве потенциальных пробиотиков.

В качестве контрольных штаммов в нашей работе использовали пробиотические штаммы, зарекомендовавшие себя как эффективные и безопасные – штамм *E. faecium* L3 и штамм *L. plantarum* 8P-A3. Оба штамма долго и успешно применяются в России для лечения различных дисбиотических состояний и заболеваний, сопряженных с дисбиозом.

Препараты на основе *E. faecium* L3 производятся ООО «Авена» с 1992 года («Ламинолакт», «Бакфир» «Био-Био»). Исследования, направленные на изучение свойств этого штамма, опубликованы в ведущих научных изданиях [13, 16, 18, 33, 107, 202].

Препараты на основе штамма *L. plantarum* 8P-A3 производятся с 1973 года [27] и, согласно инструкции производителя, предназначены для лечения диареи различной этиологии, острых кишечных инфекций у детей, в комплексной терапии *H. pylori* – ассоциированных заболеваний и др. При том, что оба исследованных нами штамма, изолированных из пробиотических препаратов, используются довольно давно и проявили свою эффективность в лечении ряда заболеваний, природа их антагонистических свойств изучена в разной степени. Удивительным является тот факт, что, несмотря на широкое применение и длительную историю использования штамма *L. plantarum* 8P-A3 [26] только некоторые эффекты его пробиотического действия были описаны в литературе [37, 111]. Более того, публикаций относительно механизмов пробиотического действия этого штамма нет. Подобная ситуация подчеркивает положение дел в области изучения пробиотиков и продуктов функционального питания (к которым можно отнести «Мацони» и «Чакку»), используемых на территории стран СНГ. Именно поэтому проведенные в данной работе исследования, направленные на изучение пробиотического потенциала штаммов, входящих в состав молочнокислых заквасок «Мацони» и «Чакка», являются актуальными и представляющими интерес не только в области фундаментальных исследований, но и с точки зрения прикладного использования полученных результатов.

Первая задача исследования включала выделение штаммов микроорганизмов, входящих в состав и представляющих основу исследуемых молочнокислых заквасок, а также выделение

индигенных штаммов из кишечника человека. С помощью методов классической микробиологии из «Мацони» были выделены два штамма – *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2. Из молочнокислого продукта «Чакка» также было выделено два штамма лактобацилл - *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06. Контрольные штаммы *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3 также были выделены из оригинальных препаратов производителей с помощью методов классической микробиологии. Для выделения собственных штаммов молочнокислых микроорганизмов, представителей нормальной микробиоты ЖКТ человека, от пациентов с СРК нами была разработана методика забора и доставки материала. Кроме того, был разработан алгоритм быстрого получения готового продукта аутопробиотика на основе безопасных штаммов собственной кишечной микробиоты. Этот алгоритм предполагает генетическую идентификацию выделенных аутоштаммов до вида, а также анализ на отсутствие генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности.

Все штаммы, включая контрольные, были идентифицированы до вида с помощью разработанного нами метода на основе мультиплексной ПЦР. Метод позволяет идентифицировать 12 видов лактобацилл. Метод может быть использован для быстрой идентификации штаммов лактобацилл, изолированных от людей, животных, из пищевых продуктов и растений. Результаты М-ПЦР подтверждены секвенированием участков, кодирующих 16S рРНК исследуемых штаммов лактобацилл. Метод можно использовать для быстрого анализа видов лактобацилл в научных исследованиях, клинической диагностике, для контроля качества пищевых продуктов и препаратов, содержащих лактобациллы. Таким образом, на данном этапе работы были выполнены два условия, являющихся необходимыми для любого штамма, входящего в состав пищевого продукта или фармакологического препарата, согласно обобщенным критериям различных регулирующих организаций ЕС для пробиотиков - штаммы были изолированы из известного источника и были идентифицированы до вида.

Необходимым критерием для того, чтобы препарат (штамм) был признан пробиотиком в ЕС, является «контроль качества» конечного продукта. Этот термин - «контроль качества» - предполагает не только отсутствие посторонней микрофлоры и других веществ в конечном препарате, но и присутствие строго определенного штамма микроорганизма в количестве, заявленном производителем. При этом необходимым условием является наличие легко идентифицируемых маркеров (генетических), позволяющим быстро произвести анализ продукта на содержание заявленного штамма. В процессе выполнения представленной работы все штаммы, изолированные из молочнокислых продуктов, были идентифицированы с помощью метода 16S рРНК типирования. С помощью этого метода были подтверждены

видовые принадлежности всех исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов, установленные с помощью М-ПЦР. Нуклеотидные последовательности, полученные в результате секвенирования участков ДНК, кодирующих 16S рРНК штаммов, были депонированы в базу данных GenBank NCBI. Номера депонирования представлены в п. 3.2.1 настоящей работы. Требование ЕС к использованию в продукте строго определенного штамма микроорганизма было, таким образом, выполнено и для всех штаммов аутопробиотиков.

Механизмы действия пробиотиков различны и до конца не изучены. Пробиотики конкурируют с патогенными микроорганизмами за питательные вещества и места адгезии на кишечном эпителии. Определенный уровень резистентности к соляной кислоте и желчи является преимуществом для выживаемости в условиях агрессивной для микроорганизмов среды желудочно-кишечного тракта. Потому обязательными явились исследования, направленные на анализ устойчивости исследуемых молочнокислых микроорганизмов к содержанию желчи в среде и повышенной кислотности. В результате проведенных исследований была продемонстрирована способность всех исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов, изолированных из молочнокислых продуктов, выживать при рН 2,5 и содержании желчи в среде до 0,6%. Такие показатели говорят о том, что все штаммы успешно адаптируются в условиях ЖКТ человека, где рН составляет 2,5-3, а содержание желчи составляет около 0,3%.

Известно, что пробиотики синтезируют уксусную и молочную кислоты, в результате чего рН смещается в кислую сторону и происходит подавление роста патогенов. Более того, пробиотики могут синтезировать антимикробные пептиды и другие факторы антимикробной активности, позволяющие специфично подавлять рост микроорганизмов. Потому исследования, направленные на анализ спектра антимикробной активности исследуемых штаммов молочнокислых бактерий по отношению к ряду грамположительных и грамотрицательных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, являются важной характеристикой их пробиотического потенциала. Потому нами были проведены исследования по анализу антагонистической активности исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов, изолированных из молочнокислых продуктов.

В результате проведенного исследования были определены МИКА (минимальные ингибирующие концентрации антагониста) исследуемых молочнокислых микроорганизмов в отношении 40 индикаторных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая стрептококки, стафилококки, клебсиеллы, псевдомонады. Анализ результатов, полученных в ходе исследования, выявил определенные тенденции в показателях МИКА для каждого из исследуемых молочнокислых микроорганизмов. Наиболее сильными

антагонистами, как и ожидалось, проявили себя контрольные штаммы *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3. Штаммы выделены из пробиотических препаратов, доказавших свою эффективность при ряде заболеваний, и потому закономерно, что именно они проявили наибольшую способность подавлять рост штаммов патогенов. Полученные результаты полностью коррелируют с литературными данными [18, 37].

Для трех из четырех штаммов, изолированных из национальных молочнокислых продуктов - *L. delbrueckii* TS1-06, *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM2, - были характерны средние значения МИКА. Эти штаммы были способны подавлять рост почти всех индикаторных культур патогенов, однако средние показатели МИКА для этих штаммов уступали показателям МИКА контрольных штаммов, обладающих выраженными антагонистическими свойствами. Таким образом, можно предположить, что выделенные штаммы способны оказывать воздействие на патогенные микроорганизмы при попадании в ЖКТ человека или животного, предотвращая «загнивание в кишках», выражаясь словами И.И. Мечникова [24], однако в меньшей степени, чем известные пробиотики. Но убедиться в этом можно только при проведении исследований *in vivo*.

Из всех исследованных культур, штамм *L. fermentum* TS3-06 проявил наиболее слабые антагонистические свойства, и средний уровень его антагонистической активности оказался ниже уровня у других исследованных штаммов. Однако на примере этого штамма нами было обнаружено, что антимикробная активность микроорганизма может быть избирательной. Штамм *L. fermentum* TS3-06 не был способен подавлять рост ни одного из одиннадцати штаммов вида *S. agalactiae*, но при этом подавлял рост нескольких (трех) штаммов *S. pyogenes* на одном уровне с контрольными штаммами. Подобная избирательная антимикробная активность штамма-пробиотика может быть использована в практических целях: когда известен возбудитель инфекции возможен подбор пробиотического штамма, способного специфично подавить рост нежелательного агента, не вызывая при этом дисбиотических нарушений. В этом случае штаммы, обладающие избирательной антагонистической активностью, являются перспективными для селективной эрадикации конкретного патогена.

Данные, полученные в результате исследования антагонистической активности изолированных штаммов молочнокислых микроорганизмов, подтверждаются данными, полученными после исследования геномов исследуемых штаммов на наличие генов, кодирующих бактериоцины. Методом ПЦР с использованием праймеров на гены наиболее распространенных генов лактоцинов нами были проанализированы все выделенные штаммы лактобацилл. В результате проделанной работы, в геноме контрольного штамма, изолированного из пробиотического препарата «Лактобактерин» - *L. plantarum* 8P-A3 были

обнаружены гены, кодирующие плантарицины EF и A. Плантарицин EF – это двухпептидный бактериоцин, относящийся ко 2 классу, представленному небольшими, термостабильными пептидами [112]. Плантарицин A – небольшой пептид, обладающий антимикробными свойствами, но при этом одновременно являющийся феромоном [96]. Гены этих бактериоцинов располагаются на опероне, кодирующем трехкомпонентную регуляторную систему синтеза плантарицина EF. По данным литературы, такие трехкомпонентные системы встречаются среди других штаммов *L. plantarum* и часто сопровождаются генами, кодирующими другие бактериоцины, киназы, транспортные белки и др. [68]. Все вместе эти гены организованы в плантарициновый локус размером до 20000 пар нуклеотидов. В зарубежной литературе описаны несколько штаммов лактобацилл, имеющих плантарициновый локус с различной генетической организацией [68, 139, 152, 154]. Плантарициновые локусы штаммов *L. plantarum* имеют две части - консервативную и варибельную. Консервативная часть имеет размер около 11500 пар нуклеотидов и кодирует трехкомпонентную регуляторную систему синтеза плантарицина EF. Именно эту часть мы впервые обнаружили в штамме *L. plantarum* 8P-A3. Варибельная часть локуса может быть размером от 5000 до 9000 пар нуклеотидов и кодирует либо полноценную трехкомпонентную регуляторную систему синтеза плантарицина JK, либо только часть генов системы, помимо генов, функции которых не установлены.

Наличие в геноме *L. plantarum* 8P-A3 генов, кодирующих феромон-плантарицин A и двухпептидный бактериоцин EF, привело нас к решению задачи по анализу наличия в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3 участков, соответствующих консервативной и варибельной частям плантарицинового локуса. В результате проведенного исследования в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3 нами был обнаружен полноценный плантарициновый локус размером 17588 пар нуклеотидов, кодирующий помимо плантарицинов EF и A, двухпептидный плантарицин NC8. Нами была определена структура локуса и полностью расшифрована его нуклеотидная последовательность, которая была депонирована в банк данных GenBank NCBI.

Наличие локуса, кодирующего три бактериоцина в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3, полностью коррелирует с данными, полученными в результате анализа антагонистической активности лактобацилл. Из всех исследуемых штаммов лактобацилл этот штамм отличался наиболее выраженными антимикробными свойствами.

Анализ полногеномного сиквенса штамма *L. plantarum* 8P-A3 показал, что кроме плантарицинов EF, NC8 и A, расположенных на плантарициновом локусе, в геноме штамма нет генов, кодирующих бактериоцины. Таким образом, нами впервые было показано, что штамм *L. plantarum* 8P-A3, выделенный из препарата «Лактобактерин» и используемый в России с 1973 года, несет в своем геноме гены трех антимикробных пептидов, с которыми можно связать

столь выраженные антагонистические свойства штамма. Роль этих пептидов в общей антимикробной активности штамма не изучена в полной мере и потребует дальнейших исследований.

В геномах штаммов *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2, изолированных из молочнокислых продуктов «Чакка» и «Мацони», генов, кодирующих лактоцины S, F, B, 705, сакацины P и A, а также плантарицины A, S и EF, обнаружено не было. То есть ни один из штаммов, выделенных из молочнокислых заквасок, не несет генов вышеперечисленных бактериоцинов. Выбор именно этих девяти генов для анализа был обусловлен тем, что их нуклеотидные последовательности расшифрованы и доступны в базе данных GenBank NCBI. Результаты исследования антагонистической активности штаммов выявили способность исследуемых штаммов избирательно подавлять рост патогенных микроорганизмов, что может говорить о наличии не выявленных генов новых антимикробных пептидов - бактериоцинов в геноме исследуемых лактобацилл.

Как было сказано выше: пробиотики – это живые микроорганизмы, которые будучи принятыми в необходимом количестве, способны оказывать положительное воздействие на организм хозяина [151]. В конечном итоге, именно способность оказывать положительное воздействие на макроорганизм является наиважнейшим критерием для штамма, чтобы быть признанным пробиотическим. Потому, одной из задач исследования явился анализ способности некоторых исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов восстанавливать микробный баланс ЖКТ хозяина при дисбиотических состояниях. Для этого нами была использована модель индуцированного дисбиоза кишечника, разработанная д.б.н. Ермоленко Е.И. [17]. На модели лабораторных животных нами было показано, что дисбиоз ЖКТ, вызванный терапией антибиотиками, может быть купирован терапией пробиотическими микроорганизмами в виде молочнокислых заквасок. Так, после трехдневной антибиотикотерапии, вес и аппетит крыс падал, а микробный баланс содержимого толстой кишки был сильно нарушен. В фекалиях крыс достоверно снижалось количество лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, и увеличивалось количество протеев, кишечной палочки и клебсиелл. После терапии пробиотическими молочнокислыми заквасками на основе: 1) *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06; 2) *L. plantarum* 8P-A3 и 3) *E. faecium* L3 вес и аппетит животных увеличивался, а микробный баланс восстанавливался. Наиболее эффективным продуктом для лечения дисбиотического состояния на предложенной модели оказалась закваска на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06. Эти штаммы, как было показано ранее, обладали средней и низкой антагонистической активностью,

соответственно. Высоко антагонистический штамм *L. plantarum* 8P-A3, способный в количестве от 10^2 КОЕ/мл подавлять рост всех использованных в данном исследовании штаммов патогенов, был способен восстановить микробный баланс ЖКТ крыс после антибиотикотерапии. Однако, улучшение параметров здоровья животных на фоне приема этого пробиотика происходило на уровне, не отличающемся от группы контроля (не получавшей пробиотик). По окончании эксперимента было проведено вскрытие животных. Характерные изменения кишечника крыс были отмечены для группы контроля и группы, получавшей закваску на основе *L. plantarum* 8P-A3. Изменения кишечника выражались в изменении цвета кишечника к более темному, вздутии отдельных частей кишечника, неравномерном распределении содержимого кишечника, вызывавшем в некоторых частях увеличение диаметра кишечника в 2 раза, что говорит о неполном восстановлении ЖКТ после приема антибиотиков. Кишечники крыс, получавших после антибиотикотерапии закваску DF-молоко на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 и закваску на основе *E. faecium* L3, выглядели также как у здоровых крыс, не получавших антибиотики.

Наилучший результат в восстановлении микробного баланса и улучшении динамики веса и аппетита у крыс после приема антибиотиков показала закваска на основе штаммов со сравнительно низкой антагонистической активностью - *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06. Таким образом, результат, полученный в экспериментах *in vivo* на модели индуцированного дисбиоза у крыс, показал, что наличие высокой антагонистической активности не обязательно коррелирует со способностью штаммов оказывать благотворное воздействие на организм хозяина.

Завершающим этапом работы явились исследования влияния приема молочнокислых заквасок на основе исследуемых штаммов микроорганизмов и аутопробиотиков на пациентов с СРК. Исследования проводили совместно с сотрудниками Северо-Западного Медицинского Университета им. И.И. Мечникова на базе Городской больницы №26. Для проведения исследований были выбраны следующие микроорганизмы: *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 в виде симбиотической молочнокислой закваски; аутоштаммы *Lactobacillus spp.*; *E. faecium* L3; аутоштаммы *E. faecium*.

В исследованиях принимали участие пациенты с синдромом раздраженного кишечника (СРК). СРК – состояние, при котором существенно снижается качество жизни пациента, и важно оказать мягкое воздействие на организм с целью купирования основных болевых симптомов пациентов. Именно поэтому для дальнейших исследований были отобраны штаммы *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06, проявившие свой потенциал в восстановлении нормального функционирования ЖКТ в исследованиях на животных. Терапия

аутопробиотическими штаммами также является мягким воздействием на организм пациента, так как пациент получает продукт, полученный на основе собственных штаммов микробиоты кишечника. Важными показателями успешности исследований всех типов молочнокислых заквасок явились показатели динамики клинических проявлений СРК. После курса пробиотической и аутопробиотической терапии во всех группах пациентов было отмечено достоверное улучшение состояния больных. У обследуемых пациентов заметно уменьшилась выраженность болевого синдрома, метеоризма, было отмечено достоверное изменение формы стула. Были выявлены статистически достоверные отличия в группах до и после лечения пробиотиками. Между группами статистически достоверных отличий выявлено не было. Однако было бы неверным утверждать, что все препараты производят одинаковое воздействие на организм пациента с СРК. Заключение о разнице при терапии пробиотиками и аутопробиотиками можно сделать только при проведении исследований на большем количестве пациентов с использованием двойного слепого плацебо-контролируемого исследования. По результатам проведенного нами исследования, которое можно рассматривать как пилотное, были получены значимые результаты, заключающиеся в том, что применение пробиотической и аутопробиотической терапии у больных с СРК достоверно уменьшает выраженность клинических проявлений страдания у пациентов. Более того, во всех группах наблюдалось улучшение общего самочувствия и настроения пациентов.

В результате проделанной работы были проанализированы штаммы молочнокислых микроорганизмов, изолированные из молочнокислых продуктов и пробиотических препаратов, на предмет их пробиотического потенциала на моделях *in vitro* и *in vivo*. Был разработан и апробован алгоритм получения аутопробиотиков на основе собственных штаммов молочнокислых микроорганизмов, изолированных из кишечника человека. Разработанный метод включал генетическую идентификацию и характеристику штаммов *Lactobacillus spp.* и *E.faecium*, что было предложено впервые. Было показано, что исследования свойств и эффектов молочнокислых микроорганизмов является необходимым для их обоснованного применения в практике. Анализ всех штаммов, которые используются на территории нашей страны для производства пищевых продуктов и пробиотических препаратов, является необходимым условием для безопасности подобных продуктов. Создание пробиотических продуктов на основе штаммов, зарекомендовавших себя как эффективные и безопасные на протяжении всей истории их применения, как в пищевых продуктах домашнего приготовления, так и в фармацевтических препаратах, должно быть построено не на эмпирических знаниях об эффектах, оказываемых этими продуктами, но на глубоком понимании их свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время особенно вырос интерес к изучению национальных продуктов, получаемых путем ферментации (молочнокислого брожения) на предмет их микробиологического состава, питательной ценности и положительного влияния на организм человека. В большей степени это связано с развитием пищевой промышленности, растущий рынок которой постоянно требует новых идей в области здорового питания, которое стало ведущим трендом последних лет. Однако немаловажную роль играют и сами потребители, повышенные запросы которых именно на здоровую пищу, заставляют производителей искать новые пути для создания инновационных продуктов. Во всех странах мира есть продукты, получаемые путем спонтанного молочнокислого брожения на основе разных типов сырья (молоко, капуста, мясо), которые стали частью культуры потребления и приготовления пищи. При этом если первоначально ферментацию сырья использовали как способ сохранения молока и других продуктов в условиях теплого климата, то постепенно отбирались культуры бактерий или консорциумы бактерий и грибов, оказывающих наиболее выраженное положительное воздействие на здоровье человека. Закваски бактерий и рецептура молочнокислых продуктов, таких как йогурт, джургут, айран, кумыс, мацони, стали передаваться из семьи в семью, как нечто, обладающее целебной или даже сакральной силой. Появление новейших методов научного анализа, а также интерес человека к изучению механизмов положительного влияния таких продуктов или их составляющих на организм человека, привели к возникновению целой области медико-биологических исследований, посвященных микроорганизмам - пробиотикам. Пробиотики — это живые микроорганизмы, которые будучи принятыми в необходимом количестве, способны оказывать положительное воздействие на организм хозяина [151].

В настоящее время пробиотики выпускают в виде всевозможных пищевых продуктов, биологически активных добавок, фармацевтических препаратов. О положительных эффектах, оказываемых пробиотиками, можно услышать по телевидению и прочитать в серьезных научных изданиях. Современный стиль жизни снизил количество потребляемых человеком молочнокислых продуктов. Это стало одной из причин участвующих расстройств в области ЖКТ. Кроме того, с увеличением стерильности окружающей среды при развитии детей в раннем возрасте, связывают возникновение аллергий и атопических дерматитов [104, 118]. Таким образом, микроорганизмы оказывают огромное влияние на организм человека, не говоря о том, что микробы составляют около 8% веса нашего тела.

Множество факторов агрессии направлены на наш организм, нарушая его микробный баланс: лекарственные препараты, особенно антибиотики, экологическая обстановка, стрессы и неправильное питание. Все эти факторы в совокупности могут приводить к заболеваниям,

осложненным нарушенным микробным балансом или дисбиозом: гастрит, СРК, язвенная болезнь желудка, ожирение, аллергии, гинекологические заболевания, злокачественные опухоли желудка и толстой кишки. Потому актуальным является создание новых всесторонне исследованных, эффективных и безопасных продуктов для восстановления и нормального функционирования микробиоты. Пробиотические препараты должны содержать штаммы, функции и эффекты которых доказаны на моделях *in vivo* и *in vitro*. Новые штаммы, предлагаемые в качестве пробиотических, должны проходить все стадии исследования, рекомендованные мировым научным сообществом и соответствующими контролирующими организациями в области пищевой промышленности и фармакологии.

Помимо традиционных пробиотиков, на основе пробиотических штаммов микроорганизмов для широкого применения, нами был предложен новый продукт – аутопробиотики. Многие ученые, работающие в области безопасности пробиотиков, настаивают на том, чтобы источником пробиотических штаммов был именно ЖКТ человека, а не растения, пищевые продукты или ЖКТ животных. В таком случае терапия индигенными штаммами, выделенными от конкретного индивидуума и применимыми в отношении единственного пациента, как нельзя лучше удовлетворяет этому требованию. Идея аутопробиотической терапии описана в нескольких публикациях последних лет, что подчеркивает актуальность данного подхода. Однако о создании готового продукта, применимого для терапии определенного заболевания, нами доложено впервые. Исследователи из США докладывают об идее использования аутоштаммов *Propionibacterium acnes* для терапии акне [78]. Кроме того, «пересадка» кишечного содержимого является инновационным методом лечения для восстановления микробного баланса ЖКТ человека после длительных курсов химио- или антибиотикотерапии в США [109]. Пересадка кишечного содержимого от донора может быть заменена пересадкой собственной микробиоты, собранной и законсервированной перед предстоящим курсом антибиотикотерапии. Таким образом, идея аутопробиотической терапии является новейшим и актуальным методом для применения в терапии заболеваний, связанных с ЖКТ человека.

В данной работе были проведены исследования по характеристике различных штаммов молочнокислых микроорганизмов с целью выявления наиболее перспективных для применения в качестве пробиотических. Впервые собственные штаммы микробиоты человека были использованы для лечения пациентов с синдромом раздраженного кишечника и показана эффективность такой терапии.

Генетический анализ организации плантарицинового локуса известного российского штамма *L. plantarum* 8P-A3, выделенного из препарата "Лактобактерин", выявил наличие генов,

кодирующих плантарицины EF и NC8, а также феромон-плантарцин А. Полногеномное секвенирование штамма *L. plantarum* 8P-A3 установило хромосомную локализацию плантарицинового локуса. Наличием генов, кодирующих антимикробные пептиды в штамме *L. plantarum* 8P-A3, могут объясняться высокие антагонистические свойства штамма. Однако, для определения вклада, который вносят обнаруженные бактериоцины в общую антимикробную активность штамма *L. plantarum* 8P-A3, необходимы дополнительные исследования.

Приоритетом современных пищевых и фармакологических предприятий, занимающихся производством различных продуктов, содержащих пробиотики должна быть безопасность конечного продукта. На мировом рынке наблюдается большая конкуренция между различными препаратами пробиотиками, однако со временем наиболее эффективные препараты и продукты, свойства которых широко освещены в научной литературе, вытеснят не качественные и не эффективные. EFSA с каждым годом ужесточает регулирование производства продуктов и препаратов, содержащих живые микроорганизмы. Потому все штаммы, использующиеся при создании пробиотиков, как уже использующиеся, так и новые, должны быть всесторонне охарактеризованы. Более того, информация о доказанных свойствах и эффектах должна быть представлена в инструкции по применению или опубликована на доступном широкой общественности ресурсе.

ВЫВОДЫ

1. На основании исследования адаптационных, физиологических и генетических свойств среди штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из национальных молочнокислых продуктов и кишечника человека в период 2007-2012 гг., отобраны в качестве наиболее перспективных для получения пробиотиков и аутопробиотиков 47 штаммов бактерий, относящихся к видам *E. faecium*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii subs. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L. helveticus*.
2. Впервые в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3, используемого в России с 1973 года, выявлен плантарициновый локус размером 17588 п.н. и определена его структура. Анализ полногеномного сиквенса *L. plantarum* 8P-A3 показал, что кроме плантарицинов А, ЕF и NC8, расположенных на плантарициновом локусе, геном не несет других генов, кодирующих бактериоцины.
3. Разработан метод генетической идентификации лактобацилл на основании мультиплексной ПЦР с использованием видоспецифических праймеров, который является эффективным инструментом для быстрого определения видовой принадлежности лактобацилл, выделенных из различных источников.
4. Продемонстрирована способность симбиотической молочнокислой закваски на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 восстанавливать микробный баланс на фоне дисбиоза, вызванного приемом антибиотиков, на модели лабораторных животных. Установлена способность этих штаммов выживать в условиях, приближенных к встречающимся в ЖКТ человека – при pH 2,5 и содержании желчи в среде 0,3%.
5. Разработан метод получения аутопробиотических молочнокислых заквасок на основе безопасных штаммов собственной кишечной микробиоты (родов *Enterococcus* и *Lactobacillus*). Алгоритм получения аутопробиотика включает генетическую идентификацию выделенных аутоштаммов до вида, а также анализ на отсутствие генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности.
6. Курсовой прием молочнокислых заквасок на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06, *E. faecium* L3, а также на основе аутопробиотических штаммов *E. faecium* и *Lactobacillus spp.* пациентами с синдромом раздраженного кишечника показал клиническую эффективность приема аутопробиотиков и пробиотиков при данном заболевании.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определение видовой принадлежности штаммов молочнокислых микроорганизмов, а также их генетических характеристик должны являться необходимым требованием при использовании штаммов при производстве пробиотических продуктов и препаратов.

Предложенный подход для анализа пробиотических свойств молочнокислых микроорганизмов *in vitro* может быть использован для отбора наиболее перспективных штаммов, выделенных из различных источников.

Консервация отдельных штаммов микробиоты может быть предложена широкому кругу лиц с целью создания биобанка при приготовлении аутопробиотиков для коррекции дисбиотических нарушений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования будут направлены на детальное изучение генетических характеристик молочнокислых микроорганизмов с целью определения роли отдельных генов в физиологической активности молочнокислых бактерий.

Предполагается продолжение исследований в области создания поликомпонентных аутопробиотиков на основании генетически охарактеризованных штаммов собственной микробиоты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ/мл – количество колониеобразующих единиц на 1 миллилитр питательной среды

МИКА – минимальная ингибирующая концентрация антагониста

М-ПЦР – мультиплексная полимеразная цепная реакция

МРС – питательная среда для лактобацилл (англ. deMan, Rogosa, Sharp)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная РНК

СГА – стрептококки группы А

СГВ – стрептококки группы В

СРК – синдром раздраженного кишечника

ВНИ – питательная среда Сердечно-Мозговой бульон (англ. Brain Heart Infusion)

DF-молоко – закваска, на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06

EFSA – European Food Safety Authority (Европейский Департамент Безопасности Пищевых Продуктов)

GRAS – generally recognized as safe (в целом признанный безопасным)

LB – питательная среда по Лурия-Бертани (англ. Luria-Bertani)

lgКОЕ/мл – логарифм количества колониеобразующих единиц на 1 миллилитр питательной среды

ТАЕ – трис-ацетатный буфер для электрофореза

ТН – питательная среда по Тодду-Хьюиту (англ. Todd-Hewitt)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин, А.В. Поликомпонентные пробиотические препараты – конструирование, производство и стратегия их продвижения на российском фармацевтическом рынке: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Алешкин Андрей Владимирович. - М., 2011. - 47 с.
2. Алешкин, В.А. Становление пробиотикотерапии в России / В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.В. Поспелова, А.А. Воробьев, Л.В. Феклисова, Ю.В. Несвижский, А.М. Амерханова, Л.В. Пожалостина, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, В.Ю. Давыдкин, В.М. Лахтин, И.Ю. Давыдкин // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2005. - №12. - С. 3-13.
3. Амерханова, А.М. Новые биопрепараты-синбиотики и их использование в неонатологии с профилактической целью / А.М. Амерханова, Л.П. Пономарева, А.С. Анкирская, О.Е. Бондарь, С.А. Лисунова, С.А. Фурсова, О.Г. Жиленкова, Е.С. Зубкова, А.А. Кураленко // Вопросы детской диетологии. - 2006. - Т. 4, № 6 - С. 66-69.
4. Барышникова, Н. *Enterococcus faecium* штамм L3 как антихеликобактерное средство: эффективность *in vitro* / Н. Барышникова, Ю. Успенский, А. Сварваль, Р. Ферман, А. Жебрун, А. Суворов // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4, № S. – С. 32.
5. Блинов, А.И. Принципы использования пробиотических лактобацилл в акушерстве и гинекологии / А.И. Блинов, Н.А. Глушанова, В.В. Бахаев // Бюллетень Восточно-Сибирского Научного Центра СО РАМН. - 2007. - Т. 3, № S. - С. 16-18.
6. Бондаренко, В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2008. - № 3. - С. 14-20.
7. Бондаренко, В.М. Различия по набору генов патогенности производственных и выделенных от больных штаммов энтерококков / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов, А.Е. Вершинин, Е.И. Ермоленко, В.В. Колоджиева, К.Б. Грабовская, Б.В. Климович // Биопрепараты. - 2008. - Т. 8, № 4. - С. 3-6.
8. Ботина, С.Г. Реклассификация отечественных пробиотических культур бактерий рода *Lactobacillus* / Ботина С.Г., Климина К.М., Коробан Н.В., Амерханова А.М., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. // Генетика. - 2010. - Т. 46, № 11. - С. 1485-1492.
9. Вахитов, Т.Я. Современные подходы к регуляции состава микробиоты кишечника / Т.Я. Вахитов, С.И. Ситкин, Е.В. Демьянова // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2018. - № 2. - С. 4-6.

10. Гончарова, В.В. Изучение бифидобактерий, разработка препарата «сухой бифидумбактерин» и его эффективность при кишечных заболеваниях детей первого года жизни: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Гончарова В.В. - М., 1970.- 15 с.
11. Гончар, Н.В. Современные технологии профилактики инфекционных осложнений у недоношенных детей / Н.В. Гончар, Л.А. Ло Скиаво, А.Н. Суворов, С.Г. Григорьев // Журнал инфектологии. - 2016. - Т. 8, № 1. - С. 32-37.
12. Грачева, Н.М. Современное лечение диарей различного генеза с использованием пробиотических препаратов / Н.М. Грачева, А.А. Аваков, О.С. Партин, И.Т. Щербаков, А.И. Соловьева // Инфекционные болезни. - 2007. - Т. 5, № 1. - С. 47-53.
13. Гунина, Л.М. Механизмы влияния пробиотика "Ламинолакт Спортивный" на показатели специальной тренированности квалифицированных спортсменов/ Л.М. Гунина // Педагогика, психология и медико-биологические проблемы физического воспитания и спорта. - 2012. - Т. 4. - С. 36-43.
14. Ермоленко, Е.И. Антагонистическая активность энтерококков в отношении *Streptococcus pyogenes* / Е.И. Ермоленко, А.Ю. Черныш, М.Н. Берлов, А.А. Тотолян, А.Н. Суворов // Вестник Санкт-Петербургского Университета. - 2008. - Т. 1, № 1. - С. 18-25.
15. Ермоленко, Е.И. Влияние аутопробиотиков на иммунитет при коррекции экспериментального дисбиоза / Е.И. Ермоленко, М.П. Котылева, И.В. Кудрявцев, Н.С. Лавренова, Т.А. Крамская, Г.Ф. Леонтьева, Л.Б. Куляшова, А.Н. Суворов // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19, № S - С. 28-29.
16. Ермоленко, Е.И. Влияние пробиотических энтерококков на рост *Streptococcus agalactiae* / Е.И. Ермоленко, А.Ю. Черныш, И.В. Марцинковская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2007. - Т. 5, № 3. - С. 73-77.
17. Ермоленко, Е.И. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками / Е.И. Ермоленко, В.Н. Донец, Ю.В. Дмитриева, Ю.Ю. Ильясов, М.А. Суворова, Л.В. Громова // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. - 2009. - Т. 1. - С. 157-167.
18. Ермоленко, Е.И. Угнетение репродукции вируса простого герпеса 1-го типа пробиотическими бактериями в системе *in vitro* / Е.И. Ермоленко, В.А. Фураева, В.А. Исаков, Д.К. Ермоленко, А.Н. Суворов // Вопросы вирусологии. - 2010. - Т. 55, № 4. - С. 9.
19. Жиленкова, О.Г. Селекция производственно-перспективных штаммов бифидобактерий, выделенных от детей: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Жиленкова Ольга Геннадьевна. - М., 2011.- 29 с.

20. Ильин, В.К. Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания / В.К. Ильин, А.Н. Суворов, Н.В. Кирюхина, Н.А. Усанова, Л.В. Старкова, В.В. Бояринцев, А.Б. Карасева // Вестник РАМН. – 2013. - №2. - С. 56-62.
21. Кафарская, Л.И. Практика педиатра: роль пробиотиков в нормализации баланса микробиоты кишечника у детей / Л.И. Кафарская, А.Н. Шкопоров, А.В. Чаплин, А.П. Пикина, Б.А. Ефимов // Вопросы детской диетологии. - 2016. - Т. 14, № 3. - С. 22-28.
22. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Квасников Е.И. Нестеренко О.А. Москва: Наука, 1975. - 391 с.
23. Ло Скиаво, Л.А. Пробиотики в питании недоношенных детей / Л.А. Ло Скиаво, Н.В. Гончар, А.Н. Суворов, Н.П. Шабалов, М.С. Федорова // Вопросы практической педиатрии. - 2014. - Т. 9, № 6. - С. 32-36.
24. Мечников, И.И. Этюды о природе человека / Мечников Илья Ильич. - Москва: Научное слово, 1905. - 292 с.
25. Мечников, И.И. О дієтичеськомъ значеніи «кислаго молока» проф. Мечникова. Клиническія наблюденія изъ СПб. Морского Госпиталя, доктора мед. Г. А. Макарова. / Мечников Илья Ильич. - С.-Петербургъ: Изданіе К. Л. Риккера. Невскій пр., 14., 1907 г.
26. Молохова, Е.И. Терапевтические пробиотические препараты на российском фармацевтическом рынке / Е.И. Молохова, В.Н. Тарасевич // Фармация. - 2000. - Т. 3. - С. 55-58.
27. Несчисляев, В.А. Пробиотики: ретроспектива, проблемы и достижения научно-производственной практики НПО Биомед / В.А. Несчисляев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1998. - Т. 2. - С. 100-102.
28. Патент 2139070 Российская Федерация, МПК А61К 35/74, С12N 1/20. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы / Б.А. Шендеров, М.А. Манвелова; заявитель и патентообладатель Б.А. Шендеров. - № 99105814/13; заявл. 31.03.1999; опубл. 10.10.1999, Бюл. № 1. - 3 с.
29. Патент 2246957 Российская Федерация, МПК А61К35/74, А61К33/00, А61К38/00, А61К31/732, А61Р1/04. Способ лечения хронического *H. pylori*-ассоциированного гастрита препаратом Ламиноакт / В.И. Симаненков, А.Н. Суворов, Н.В. Захарова, Д.И. Боваева, О.И. Соловьева; заявитель и патентообладатель Санкт-Петербургская Медицинская Академия Последипломного образования. - № 2002129641/14; заявл. 04.11.2002; опубл. 27.02.2005, Бюл. № 1. - 3 с.
30. Патент SU1286212 СССР, МПК А61К 35/74. Способ лечения дисбактериоза / В.М. Коршунов, Н.А. Синицина, Б.В. Пинегин, Г.А. Гиноман; заявитель и патентообладатель

- второй Московский государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова. - № 3769186/28-14; заявл. 25.07.1984; опубл. 30.01.1987, Бюл. № 4. - 3 с.
31. Симаненков, В.И. Постинфекционный синдром раздраженного кишечника / В.И. Симаненков, И.А. Шумихина, З.Р. Сундукова // Гастроэнтерология. Хирургия. Интенсивная терапия. Consilium Medicum. - 2019. - № 1. - С. 42-46.
 32. Суворов, А.Н. Возможности некоторых пробиотических штаммов в эрадикации *Helicobacter pylori in vitro* и *in vivo* / А.Н. Суворов, Н.В. Барышникова, А.В. Сварваль, Р.М. Ниязов // Фарматека. - 2018. - Т. 2, № 335. - С. 74-78.
 33. Суворов, А.Н. Мир микробов и человек / Суворов А.Н. // Природа. - 2015. - Т. 5. - С. 11-19.
 34. Тарасова, И.Б. Разработка бактериального препарата «Лактобактерин» для нормализации биофлоры кишечника: автореф. дисс...д-ра.биол. наук: 03.00.07 / Тарасова И.Б. - М, 1970. - 29 с.
 35. Тотолян, А.А. Стрептококки группы В в патологии человека / А.А. Тотолян, А.Н. Суворов, А.В. Дмитриев. Санкт-Петербург: Человек, 2009. - 212 с.
 36. Феклисова, Л.В. Результаты многоцентрового исследования применения комбинированного препарата-пробиотика у больных респираторными инфекционными заболеваниями / Л.В. Феклисова, Е.Е. Целипанова, Л.А. Галкина, Н.А. Савицкая, Е.А. Воропаева, Л.В. Пожалостина, Т.В. Мацулевич // Детские инфекции. - 2010. - Т. 3. - С. 53-57.
 37. Циммерман, Я.С. Микробный антагонизм и обоснование включения пробиотиков в комплексное лечение *Helicobacter pylori*-зависимых заболеваний / Я.С. Циммерман, В.А. Несчисляев, Л.В. Субботина // Клиническая медицина. - 2010. - Т. 4. - С. 35-42.
 38. Шарипова, И.С. Оценка лечебно-профилактического действия свечей с лактобактерином на микробиоценоз кишечника детей / И.С. Шарипова, В.И. Сергевнин, Э.Л. Красинский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1993. - Т. 6. - С. 30-31.
 39. Achemchem, F. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco / F. Achemchem, M. Martínez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia, M. Maqueda // Journal of applied microbiology. - 2005. - Vol. 99, № 1. - P. 141-150.
 40. Adimpong, D.B. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products / D.B. Adimpong, D.S. Nielsen, K.I. Sørensen // BMC Microbiology. - 2012. - Vol. 12, № 75. - P. 1-12.
 41. Anderssen, E.L. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. / E.L. Anderssen, D.B. Diep, I.F. Nes, V.G.H. Eijsink, J. Nissen-Meyer // Applied and Environmental Microbiology. - 1998. - Vol. 64. - P. 2269-2272.

42. Angelakis, E. Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry / E. Angelakis, M. Million, M. Henry, D. Raoult // Journal of food science. - 2011. - Vol. 76, № 8. - P. M568-M572.
43. Arumugam, M. Enterotypes of the human gut microbiome / M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D.R. Mende, G.R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls et al. // Nature. - 2011. - Vol. 473, № 7346. - P. 174-180.
44. Axelsson, L. Lactic acid bacteria / L. Axelsson, S. Ahrne // Applied microbial systematics / ed. F.G. Priest, M. Goodfellow. Netherlands: Springer, 2000. - 479 p.
45. Badet C. Ecology of Lactobacilli in the oral cavity: a review of literature / C. Badet, N.B. Thebaud // The open microbiology journal. - 2008. - Vol. 2. - P. 38-48.
46. Barratt, M.J. The gut microbiota, food science, and human nutrition: a timely marriage / M.J. Barratt, C. Lebrilla, H. Shapiro, J.I. Gordon // Cell Host & Microbe. - 2017. - Vol. 22, № 2. - P. 134-141.
47. Bonsante, F. Routine probiotic use in very preterm infants: retrospective comparison of two cohorts / F. Bonsante, S. Lacobelli, J.B. Gouyon // American journal of perinatology. - 2013. - Vol. 30, № 1. - P. 41-46.
48. Borriello, S.P. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria / S.P. Borriello, W.P. Hammes, W. Holzapfel, P. Marteau, J. Schrezenmeir, M. Vaara, V. Valtonen // Clinical Infectious Diseases. - 2003. - Vol. 36. - P. 775-780.
49. Bourbia, M. Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives / M. Bourbia, D. Ma, D.G. Cvitkovitch, J.P. Santerre, Y. Finer // Journal of dental research. - 2013. - Vol. 92, № 11. - P. 989-994.
50. Boyd, M. Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of *Lactobacillus* Species / M. Boyd, M. Antonio, S. Hillier // Journal of Clinical Microbiology. - 2005. - Vol. 43, № 10. - P. 5309–5311.
51. Brolazo, E.L. Correlation between Api 50 and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli isolates / E.L. Brolazo, D.S. Leite, M.R. Tiba, M. Villarroel, C. Marconi, J.A. Simoes // Brazil Journal of microbiology. - 2011. - Vol. 42, № 1. - P. 225–232.
52. Caporaso, J.G. Moving pictures of the human microbiome / J.G. Caporaso, C.L. Lauber, E.K. Costello, D. Berg-Lyons, A. Gonzalez, J. Stombaugh, D. Knights, P. Gajer, J. Ravel, N. Fierer, J.I. Gordon, R. Knight // Genome Biology. - 2011. - Vol. 12, № 5. - P. R50.
53. Casaus, P. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A / P. Casaus, T. Nilsen, L.M. Cintas, I.F. Nes, P.E. Hernández, H. Holo // Microbiology. - 1997. - Vol. 143, № Pt7. - P. 2287-2294.

54. Cerdó, T. Maternal obesity is associated with gut microbial metabolic potential in offspring during infancy / T. Cerdó, A. Ruiz, R. Jáuregui, H. Azaryah, F.J. Torres-Espínola, L.García-Valdés, M. Teresa Segura, A. Suárez, C. Campoy // *Journal of physiology and biochemistry*. - 2018. - Vol. 74, № 1. - P. 159-169.
55. Chang, S.Y. Enterocin TW21, a novel bacteriocin from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 / S.Y. Chang, Y.S. Chen, S.F. Pan, Y.S. Lee, C.H. Chang, C.H. Chang, B. Yu, H.C. Wu // *Journal of applied microbiology*. - 2013. - Vol. 115, № 3. - P. 673-678.
56. Cheng, S. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium* / S. Cheng, F. K. McCleskey, M. J. Gress // *Journal of clinical microbiology*. - 1997. - Vol. 35, № 5. - P. 1248-1250.
57. Chermesh, I. Probiotics and the gastrointestinal tract: Where are we in 2005? / I. Chermesh, R. Eliakim // *World Journal of Gastroenterology*. - 2006. - Vol. 12, № 6. - P. 853-857.
58. Creti, R. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources / R. Creti, M. Imperi, L. Bertuccini, F. Fabretti, G. Orefici, R. Di Rosa, L. Baldassarri // *Journal of Medical Microbiology*. - 2004. - Vol. 23, № 1. - P. 13-20.
59. Croxatto, A. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. / A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2012. - Vol. 36, № 2. - P. 380-407.
60. de Roos, N.M. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998 / N.M. de Roos, M.B. Katan // *The American Journal of Clinical Nutrition*. - 2000. - Vol. 71, № 2. - P. 405-411.
61. De Vuyst, L. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications / L. De Vuyst, F. Leroy // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. - 2007. - Vol. 13, № 4. - P. 194-199.
62. De Vuyst, L. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota / L. De Vuyst, G. Vrancken, F. Ravyts, T. Rimaux, S. Weckx // *Food microbiology*. - 2009. - Vol. 26, №7. - P. 666-675.
63. De Vuyst, L. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations / L. De Vuyst, L. Avonts, P. Neysens, B. Hoste, M. Vancanneyt, J. Swings, R. Callewaert // *International Journal of food microbiology*. - 2004. - Vol. 90, № 1. - P. 93-106.
64. Deshpande, G. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates / G. Deshpande, S. Rao, S. Patole, M. Bulsara // *Pediatrics*. - 2012. - Vol. 125, № 5. - P. 921-930.

65. Deshpande, G.C. Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates / G.C. Deshpande, S.C. Rao, A.D. Keil, S.K. Patole // BMC Medicine. - 2011. - Vol. 9, № 92. - P. 1-13.
66. Di Caro, S. Effects of Lactobacillus GG on genes expression pattern in small bowel mucosa / S. Di Caro, H. Tao, A. Grillo // Digestive and liver disease. - 2005. - Vol. 37, № 5. - P. 320-329.
67. Di Pierro, F. Use of a probiotic mixture containing *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB12 and *Enterococcus faecium* L3 in atopic children / F. di Pierro, I. Basile, M. Danza, L. Venturelli, R. Contini, P. Risso, M. Colombo // Minerva pediatrica. - 2018. - Vol. 70, № 5. - P. 418-424.
68. Diep, D.B. An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum* / D.B. Diep, D. Straume, M. Kjos, C. Torres, I.F. Nes // Peptides. - 2009. - Vol. 30, № 8. - P. 1562-1574.
69. Drider, D. The continuing story of class IIa bacteriocins / D. Drider, G. Fimland, Y. Hechard, L. McMullen, H. Prevost // Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 2006. - Vol. 70. - P. 564-582.
70. Dunne, C. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings / C. Dunne, L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan, J.K. Collins // The American Journal of Clinical Nutrition. - 2001. - Vol. 7. - P. 386S-392S.
71. Eckburg, P.B. The role of microbes in Crohn's disease / P.B. Eckburg, D.A. Relman // Clinical Infectious Diseases. - 2007. - Vol. 2, № 44. - P. 256-262.
72. El Aidy, S. The gut microbiota and mucosal homeostasis: colonized at birth or at adulthood, does it matter? / S. El Aidy, G. Hooiveld, V. Tremaroli, F. Bäckhed, M. Kleerebezem // Gut Microbes. - 2013. - Vol. 4, № 2. - P. 118-124.
73. Elazab, N. Probiotic administration in early life, atopy, and asthma: a meta-analysis of clinical trials / N. Elazab, A. Mendy, J. Gasana, E.R. Vieira, A. Quizon, E. Forno // Pediatrics. - 2013. - Vol. 132, № 3. - P. e666-676.
74. Euzéby, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet / Euzéby J.P. // International journal of systematic bacteriology. - 1997. - Vol. 47. - P. 590-592.
75. Felis, G.E. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria / G.E. Felis, F. Dellaglio // Current Issues of Intestinal Microbiology. - 2007. - Vol. 8, № 2. - P. 44-61.
76. Ferretti J.J. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes* / J.J. Ferretti, W.M. McShan, D. D.J. Ajdic Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A.N. Suvorov, S. Kenton, H.S. Lai, S.P. Lin, Y. Qian, H.G. Jia, F.Z. Najjar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S.W. Clifton, B.A. Roe, R. McLaughlin // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2001. - Vol. 98, № 8. - P. 4658-4663.

77. Fisher, K. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* / K. Fisher, C. Phillips // Microbiology. - 2009. - Vol. 155, № 6. - P. 1749-1757.
78. Fitz-Gibbon, S. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne / S. Fitz-Gibbon, S. Tomida, B.H. Chiu, L. Nguyen, C. Du, M. Liu, D. Elashoff, M.C. Erfe, A. Loncaric, J. Kim, R.L. Modlin, J.F. Miller, E. Sodergren, N. Craft, G.M. Weinstock, H. Li // The journal of investigative dermatology. - 2013. - Vol. 133, № 9. - P. 2152-2160.
79. Foulquié Moreno, M.R. The role and application of enterococci in food and health / M.R. Foulquié Moreno, P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, L. De Vuyst // International journal of food microbiology. - 2006. - Vol. 106, № 1. - P. 1-24.
80. Franz, C.M. Enterococci at the crossroads of food safety? / C.M. Franz, W.H. Holzapfel, M.E. Stiles // International journal of food microbiology. - 1999. - Vol. 47, № 1-2. - P. 1-24.
81. Fukuda, S. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate / S. Fukuda, H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J.M. Clarke, D.L. Topping, T. Suzuki, T.D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, H. Ohno. // Nature. - 2011. - Vol. 469. - P. 543-549.
82. Fuller, R. Probiotics in man and animals / R. Fuller // Journal of Applied Bacteriology. - 1989. - Vol. 66, № 5. - P. 365-378.
83. Galloway-Pena, J. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium* / J. Galloway-Pena, J.H. Roh, M. Latorre, X. Qin, B. Murray // PLoS one. - 2012. - Vol. 7, № 1. - P. e30187.
84. Galvez, A. Bacteriocin based strategies for food biopreservation / A. Galvez, H. Abriouel, R. Lopez, N. Ben Omar // International Journal of Food Microbiology. - 2007. - Vol. 120. - P. 51-70.
85. Gill, S.R. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome / S.R. Gill, M. Pop, R.T. Deboy // Science. - 2006. - Vol. 31, № 5778. - P. 1355-1359.
86. Gilmore, M.S. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance / ed. M.S. Gilmore, D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, L.B. Rice. Washington, DC: ASM, 2002. - 439 p.
87. Giraffa, G. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology / G. Giraffa, N. Chanishvili, Y. Widyastuti // Research in microbiology. - 2010. - Vol. 161. - P. 480-487.
88. Gong, H.S. Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella typhimurium* / H.S. Gong, X.C. Meng, H. Wang // Journal of Basic Microbiology. - 2010. - Vol. 50, Suppl 1. - P. S37-45.

89. Gonzalez, A. Our microbial selves: what ecology can teach us / A. Gonzalez, J.C. Clemente, A. Shade, J.L. Metcalf, S. Song, B. Prithiviraj, B.E. Palmer, R. Knight // European Molecular Biology Organization Reports. - 2011. - Vol. 12, № 8. - P. 775–784.
90. Gordon, J.I. A rendezvous with our microbes / J.I. Gordon, T.R. Klaenhammer // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2011. - Vol. 108. - P. 4513-4515.
91. Greenblum, S. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease / S. Greenblum, P.J. Turnbaugh, E. Borenstein // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2012. - Vol. 109, № 2. - P. 594-559.
92. Guandalini, S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea / S. Guandalini // Journal of clinical gastroenterology. - 2011. - Vol. 45, № S1. - P. 49-53.
93. Hanlon, P.R. GRAS from the ground up: review of the interim pilot program for GRAS notification / P.R. Hanlon, J. Frestedt, K. Magurany // Food and Chemical Toxicology. - 2017. - № 105. - P. 140-150.
94. Harper, A. The role of bacteria, probiotics and diet in irritable bowel syndrome / A. Harper, M.M. Naghibi, D. Garcha // Foods. - 2018. - Vol. 27, № 2. - P. E13, 20 p.
95. Hattori, M. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology / M. Hattori, T.D. Taylot // DNA research. - 2009. - Vol. 16. - P. 1-12.
96. Hauge, H.H. Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms / H.H. Hauge, D. Mantzilas, G.N. Moll, W.N. Konings, A.J. Driessen, V.G. Eijsink, J. Nissen-Meyer // Biochemistry. - 1998. - Vol. 37. - P. 16026–16032.
97. Heikens, E. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162 / E. Heikens, M.J. Bonten, R.J. Willems // Journal of bacteriology. - 2007. - Vol. 22, № 189. - P. 8233-8240.
98. Heilig, H.G. Molecular diversity of *Lactobacillus spp.* and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA / H.G. Heilig, E.G. Zoetendal, E.E. Vaughan // Applied and environmental microbiology. - 2002. - Vol. 68, № 1. - P. 114-123.
99. Herbel, S.R. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus* / S.R. Herbel, W. Vahjen, L.H. Wieler, S. Guenther // Gut pathogens. - 2013. - Vol. 5, № 27. - P. 1-13.
100. Holzapfel, W. *Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics / W. Holzapfel, A. Arini, M. Aeschbacher, R. Coppolecchia, B. Pot // Beneficial microbes. - 2018. - Vol. 9, № 3. - P. 375-388.

101. Hooper, L.V. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity / L.V. Hooper, T.S. Stappenbeck, C.V. Hong, J.I. Gordon // *Nature Immunology*. - 2003. - Vol. 4. - P. 269-273.
102. Hurtado, A. Lactic acid bacteria from fermented table olives / A. Hurtado, C. Reguant, A. Bordons, N. Rozès // *Food microbiology*. - 2012. - Vol. 31, № 1. - P. 1-8.
103. Husni, R.N. *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. / R.N. Husni, S.M. Gordon, J.A. Washington // *Clinical Infectious Diseases*. - 1997. - Vol. 25. - P. 1048-1055.
104. Isolauri, E. Probiotics in the development and treatment of allergic disease / E. Isolauri, S. Rautava, S. Salminen // *Gastroenterology clinics of North America*. - 2012. - Vol. 41, № 4. - P. 747-762.
105. Jeppsson, B. Use of Probiotics as Prophylaxis for Postoperative Infections / B. Jeppsson, P. Mangell, H. Thorlacius // *Nutrients*. - 2011. - Vol. 3, № 5. - P. 604–612.
106. Kaewnopparat, S. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman / S. Kaewnopparat, N. Dangmanee, N. Kaewnopparat, T. Srichana, M. Chulasiri, S. Settharaksa // *Anaerobe*. - 2013. - V. 22. - P. 6-13.
107. Kang, B. Commensal microbiota drive the functional diversification of colon macrophages / B. Kang, L. Alvarado, T. Kim, M. Lehmann, H. Cho, J. He, P. Li, B.H. Kim, A. Larochelle, B.L. Kelsall // *Mucosal Immunology*. - 2020. - V. 13, № 2. - P. 216-229.
108. Kawai, Y. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli / Y. Kawai, Y. Ishii, K. Arakawa, K. Uemura, B. Saitoh, J. Nishimura, H. Kitazawa, Y. Yamazaki, Y. Tateno, T. Itoh, T. Saito // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2004. - Vol. 70, № 5. - P. 2906-2911.
109. Khoruts, A. Therapeutic transplantation of the distal gut microbiota / A. Khoruts, M.J. Sadowsky // *Mucosal immunology*. - 2011. - Vol. 4, № 1. - P. 4-7.
110. Kim, W. Simultaneous detection of *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis*, and *S. oralis* by a novel multiplex PCR Assay targeting the *gyrB* gene / W. Kim, H.K. Park, W. Hwang, H. Shin // *Journal of clinical microbiology*. - 2013. - Vol. 51, № 3. - P. 835–840.
111. Kirpich, I.A. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study / I.A. Kirpich, N.V. Solovieva, S.N. Leikhter, N.A. Shidakova, O.V. Lebedeva, P.I. Sidorov, T.A. Bazhukova, A.G. Soloviev, S.S. Barve, C.J. McClain, M. Cave // *Alcohol*. - 2008. - Vol. 42, № 8. - P. 675-682.
112. Klaenhammer, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria / T.R. Klaenhammer // *FEMS Microbiology Reviews*. - 1993. - Vol. 12. - P. 39–86.

113. Klingberg, T.D. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages / T.D. Klingberg, L. Axelsson, K. Naterstad // International Journal of Food Microbiology. - 2005. - Vol. 105, № 3. - P. 419-431.
114. Koebnick, C. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation / C. Koebnick, I. Wagner, P. Leitzmann // Canadian journal of gastroenterology. - 2003. - Vol. 17, № 11. - P. 655-659.
115. Koh, A. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites / A. Koh, F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, F. Bäckhed // Cell. - 2016. - Vol. 165, № 6. - P. 1332-1345.
116. Kolodjjeva, V. Incidence of virulence determinants in enterococcal strains of probiotic and clinical origin / V. Kolodjjeva, R. Yafaev, E. Yermolenko, A. Suvorov // International Congress Series. - 2006. - Vol. 1289. - P. 367-369.
117. Kononen, E. Anaerobes in the upper respiratory tract in infancy / E. Kononen // Anaerobe. - 2005. - Vol. 11, №3. - P. 131-136.
118. Kozyrskyj, A.L. Increased risk of childhood asthma from antibiotic use in early life / A.L. Kozyrskyj, P. Ernst, A.B. Becker // Chest. - 2001. - Vol. 131. - P. 1753-1759.
119. Krzyściak, W. Effect of a *Lactobacillus salivarius* probiotic on a double-species *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* caries biofilm / W. Krzyściak, D. Kościelniak, M. Papież, P. Vyhouskaya, K. Zagórska-Świeży, I. Kołodziej, B. Bystrowska, A. Jurczak // Nutrients. - 2017. - Vol. 9, № 11. - p. E1242.
120. Kuda, T. In vitro cholesterol-lowering properties of *Lactobacillus plantarum* AN6 isolated from aji-narezushi / T. Kuda, T. Yazaki, M. Ono, H. Takahashi, B. Kimura // Letters in Applied Microbiology. - 2013. - Vol. 57, № 3. - P. 187-192.
121. Laue, C. Effect of a yoghurt drink containing *Lactobacillus* strains on bacterial vaginosis in women - a double-blind, randomised, controlled clinical pilot trial / C. Laue, E. Papazova, A. Liesegang, A. Pannenbeckers, P. Arendarski, B. Linnerth, K.J. Domig, W. Kneifel, L. Petricevic, J. Schrezenmeir // Beneficial microbes. - 2018. - Vol. 9, № 11. - P. 35-50.
122. Leahy, S.C. Getting better with bifidobacteria / S.C. Leahy, D.G. Higgins, G.F. Fitzgerald // Journal of applied microbiology. - 2005. - Vol. 98, № 6. - P. 1303-1315
123. Lee, H. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi / H. Lee, H. Yoon, Y. Ji, H. Kim, H. Park, J. Lee, H. Shin, W. Holzapfel // International journal of food microbiology. - 2011. - Vol. 145. - P. 155-161.

124. Levkovich, T. Probiotic bacteria induce a 'glow of health' / T. Levkovich, T. Poutahidis, C. Smillie, B.J. Varian, Y.M. Ibrahim, J.R. Lakritz, E.J. Alm, S.E. Erdman // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8, № 1. - P. e53867, 11 p.
125. Lilly, D.M. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. / D.M. Lilly, R.H. Stilwell // *Science*. - 1965. - Vol. 147, № 3659. - P. 747-748.
126. Lonnermark, E. Lactobacilli in the normal microbiota and probiotic effects of *Lactobacillus plantarum*: Doctoral thesis for PhD in medicine / Elisabet Lonnermark. - University of Gothenburg, 2010. - 101 p.
127. Lonvaud-Funel, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine / Lonvaud-Funel A. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. - 1999. - Vol. 76, № 1-4. - P. 317-331.
128. Ly, N.P. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? / N.P. Ly, A. Litonjua, D.R. Gold, J.C. Celedón // *The journal of allergy and clinical immunology*. - 2011. - Vol. 127, № 5. - P. 1087-1094.
129. Ma, B. Vaginal microbiome: rethinking health and disease / B. Ma, L.J. Forney, J. Ravel // *Annual review of microbiology*. - 2012. - Vol. 66. - P. 371-389.
130. Mangia, N.P. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening / N.P. Mangia, M.A. Murgia, G. Garau, M.G. Sanna, P. Deiana // *Food microbiology*. - 2008. - Vol. 25, № 2. - P. 366-77.
131. Margolles, A. Screening, identification and characterisation of lactobacillus and bifidobacterium strains / A. Margolles, B. Mayo, P. Ruas-Madiedo // *Handbook of probiotics and prebiotics* / ed. K. Nomoto, S. Salminen, Y.K. Lee. - New Jersey: Wiley, 2009. - 6 p.
132. Martin, D.H. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease / D.H. Martin // *American journal of medical sciences*. - 2012. - Vol. 343, № 1. - P. 2-9.
133. Mater, D.D. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. / D.D. Mater, L. Bretigny, O. Firmesse // *FEMS microbiology letters*. - 2005. - Vol. 250, № 2. - P. 185-187.
134. Mathara, J.M. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya / J.M. Mathara, U. Schillinger, P.M. Kutima // *International journal of food microbiology*. - 2004. - Vol. 94, № 3. - P. 269-278.
135. Mazmanian, S.K. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system / S.K. Mazmanian, C.H. Liu, A.O. Tzianabos, D.L. Kasper // *Cell*. - 2005. - Vol. 122. - P. 107-118.
136. Moreno, M.R. Characterization of the amylovorin locus of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, producer of a bacteriocin active against *Pseudomonas aeruginosa*, in combination with colistin

- and pyocins / M.R. Moreno, B. Baert, S. Denayer // FEMS Microbiology Letters. - 2008. - Vol. 286, № 2. - P. 199-206.
137. Muyanja, C.M. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage / C.M. Muyanja, J.A. Narvhus, J. Treimo, T. Langsrud // International journal of food microbiology. - 2003. - Vol. 80, № 3. - P. 201-210.
138. Nanno, M. Biological effects of probiotics: what impact does *Lactobacillus casei* Shirota have on us? / M. Nanno, I. Kato, T. Kobayashi, K. Shida // International journal of immunopathology and pharmacology. - 2011. - Vol. 24, Suppl. №1. - P. 45S-50S.
139. Navarro, L. Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *L. plantarum* J51 strain / L. Navarro, B. Rojo-Bezares, Y. Sáenz, L. Díez, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea, C. Torres // International Journal of Food Microbiology. - 2008. - Vol. 128, № 2. - P. 390-394.
140. Noble, C.J. Carriage of group D streptococci in the human bowel / C.J. Noble // Journal of clinical pathology. - 1978. - Vol. 4. - P. 1182–1186.
141. Palmer, C. Development of the human infant intestinal microbiota / C. Palmer, E.M. Bik, D.B. DiGiulio, D.A. Relman, P.O. Brown // PLOS Biology. - 2007. - Vol. 5, № e177.
142. Perea Vélez, M. Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from Columbian dairy products / M. Perea Vélez, K. Hermans, T.L. Verhoeven, S.E. Lebeer, J. Vanderleyden, S.C. de Keersmaecker. // Journal of Applied Microbiology. - 2007. - Vol. 103, № 3. - P. 666-674.
143. Pfeiffer, J.K. The intestinal microbiota and viral susceptibility / J.K. Pfeiffer, J.L. Sonnenburg // Frontiers in Microbiology. - 2011. - Vol. 2, № 92. - P. 25-30.
144. Piano, M.D. Comparison of the kinetics of intestinal colonization by associating 5 probiotic bacteria assumed either in a microencapsulated or in a traditional, uncoated form / M.D. Piano, S. Carmagnola, M. Ballarè, M. Balzarini, F. Montino, M. Pagliarulo, A. Anderloni, M. Orsello, R. Tari, F. Sforza, L. Mogna, G. Mogna // Journal of clinical gastroenterology. - 2012. - Vol. 46. - P. S85-92.
145. Pogačić, T. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. / T. Pogačić, A. Mancini, M. Santarelli // Food microbiology. - 2013. - Vol. 36, № 2. - P. 207-215.
146. Prince, B.T. Gut microbiome and the development of food allergy and allergic disease / B.T. Prince, M.J. Mandel, K. Nadeau, A.M. Singh // Pediatric clinics of North America. - 2015. - Vol. 62, № 6. - P. 1479-92.
147. Qin, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K.S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T.

- Yamada, D.R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang // *Nature*. - 2010. - Vol. 464, № 7285. - P. 59-65.
148. Qiu, Y. *Lactobacillus plantarum* enhanced IL-22 production in natural killer (NK) cells that protect the integrity of intestinal epithelial cell barrier damaged by enterotoxigenic *Escherichia coli* / Y. Qiu, Z. Jiang, S. Hu, L. Wang, X. Ma, X. Yang // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2017. - Vol. 18, № 11. - P. E2409, 15 p.
149. Randall, L. Evaluation of MALDI-ToF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory / L. Randall, F. Lemma, M. Koylass, J. Rogers, R.D. Ayling, D. Worth // *Research in veterinary science*. - 2015. - Vol. 101. - P. 42-49.
150. Rantsiou, K. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review / K. Rantsiou, L. Cocolin // *International journal of food microbiology*. - 2006. - Vol. 108, № 2. - P. 255-267.
151. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria / FAO/WHO. - Cordoba, Argentina, 2001.
152. Rojo-Bezares, B. Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. / B. Rojo-Bezares, Y. Sáenz, L. Navarro, R. Jiménez-Díaz, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea, C. Torres // *Archives of Microbiology*. - 2008. - Vol. 189, № 5. - P. 491-499.
153. Rubinstein, E. Vancomycin-resistant enterococci / E. Rubinstein, Y. Keynan // *Critical care clinics*. - 2013. - Vol. 29, № 4. - P. 841-852.
154. Sáenz, Y. Genetic diversity of the pln locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. / Y. Sáenz, B. Rojo-Bezares, L. Navarro, L. Díez, S. Somalo, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea, C. Torres // *International Journal of Food Microbiology*. - 2009. - Vol. 134. - P. 176-183.
155. Salminen, M.K. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland / M.K. Salminen, S. Tynkkynen, H. Rautelin // *Clinical Infectious Diseases*. - 2002. - Vol. 35. - P. 1155-1160.
156. Salminen, S. *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects* / ed. S. Salminen, A. von Wright. Boca Raton: CRC Press, 2004. - 656 p.
157. Sanders, M.E. Safety assessment of probiotics for human use / M.E. Sanders, L.M.A. Akkermans, D. Haller, C. Hammerman, J. Heimbach, G. Hörmansperger, G. Huys, D.D. Levy, F. Lutgendorff, D. Mack, P. Phothirath, G. Solano-Aguilar, E. Vaughan // *Gut Microbes*. - 2010. - Vol. 1, № 3. - P. 164-185.

- 158.Santos, A.O. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage / A.O. Santos, C.L. Avila, R.F. Schwan // Journal of dairy science. - 2013. - Vol. 30, № 2. - P. 33-39.
- 159.Savage, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract / D.C. Savage // Annual review of microbiology. - 1977. - Vol. 31. - P. 107-133.
- 160.Saxelin, M. Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. / M. Saxelin, N.H. Chuang, B. Chassy // Clinical infectious diseases. - 1996. - Vol. 22, № 3. - P. 564-566.
- 161.Sazawal, S. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials / S. Sazawal, G. Hiremath, U. Dhingra, P. Malik, S. Deb, R.E. Black // The Lancet infectious diseases. - 2006. - Vol. 6, № 6. - P. 374-382.
- 162.Scharek, L. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets / L. Scharek, J. Guth, M. Filter // Archives of animal nutrition. - 2007. - Vol. 61, № 4. - P. 223-234.
- 163.Schleifer, K.H. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. / K.H. Schleifer, R. Kilpper-Balz // International journal of systematic bacteriology. - 1984. - Vol. 34. - P. 31-34.
- 164.Sengun, I.Y. Identification of lactic acid bacteria from Tahrana, a traditional Turkish fermented food / I.Y. Sengun, D.S. Nielsen, M. Karapinar, M. Jakobsen // International journal of food microbiology. - 2009. - Vol. 135. - P. 105-111.
- 165.Servin, A.L. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens / A.L. Servin, M.H. Coconnier // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. - 2003. - Vol. 17, № 5. - P. 741-754.
- 166.Sharon, G. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease / G. Sharon, N. Garg, J. Debelius // Cell Metabolism. - 2014. - Vol. 20, № 5. - P. 719-730.
- 167.Shida, K. Daily intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers / K. Shida, T. Sato, R. Iizuka // European journal of nutrition. - 2017. - Vol. 56, № 1. - P. 45-53.
- 168.Sikorska, H. Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / H. Sikorska, W. Smoragiewicz // International journal of antimicrobial agents. - 2013. - Vol. 42, № 6. - P. 475-481.
- 169.Simkins, J. Investigation of inpatient probiotic use at an academic medical center / J. Simkins, A. Kaltsas, B.P. Currie // International Journal of Infectious diseases. - 2013. - Vol. 17, № 5. - P. e321-324

- 170.Smit, G. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products / G. Smit, B.A. Smit, W.J. Engels // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2005. - Vol. 29, № 3. - P. 591-610.
- 171.Soleman, N. A Case of *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* endocarditis and discussion of the safety of lactic acid bacteria / N. Soleman, H. Laferl, W. Kneifel, G. Tucek, E. Budschedl, H. Weber, H. Pichler, H.K. Mayer // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* - 2003. - Vol. 35, № 10. - P. 759-762.
- 172.Soliman, W. Structure-activity relationships of an antimicrobial peptide plantaricin S from two-peptide class IIb bacteriocins / W. Soliman, L. Wang, S. Bhattacharjee, K. Kaur // *Journal of Medicinal Chemistry.* - 2011. - Vol. 54. - P. 2399-2408.
- 173.Sparo, M.D. Bio-preservation of ground beef meat by *Enterococcus faecalis* CECT7121 / M.D. Sparo, A. Confalonieri, L. Urbizu, M. Ceci, S.F. Bruni // *Brazilian journal of microbiology.* - 2013. - Vol. 44, № 1. - P. 43-49.
- 174.Spencer, M.D. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency / M.D. Spencer, T.J. Hamp, R.W. Reid, L.M. Fischer, S.H. Zeisel, A.A. Fodor // *Gastroenterology.* - 2011. - Vol. 140, № 3. - P. 976-986.
- 175.Stiles, M.E. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy / M.E. Stiles, W.H. Holzapfel // *International journal of food microbiology.* - 1997. - Vol. 36, № 1. - P. 1-29.
176. Suárez, N.E. Draft genome sequence of *Enterococcus faecium* strain CRL 1879, isolated from a northwestern argentinian artisanal cheese / N.E. Suárez, L. Saavedra, I. Slozilová, J. Bonacina, K. Demnerová, F. Sesma // *Genome announcements.* - 2013. - Vol. 1, № 4. - P. e00514-13.
- 177.Suárez-García, I. *Lactobacillus jensenii* bacteremia and endocarditis after dilatation and curettage: case report and literature review / I. Suárez-García, A. Sánchez-García, L. Soler // *Infection.* - 2012. - Vol. 40. - P. 219-222.
- 178.Suzuki, N. *Enterococcus faecium* WB2000 inhibits biofilm formation by oral cariogenic streptococci / N. Suzuki, M. Yoneda, Y. Hatano, T. Iwamoto, Y. Masuo, T. Hirofuji // *International journal of dentistry.* - 2011. - Article ID 834151, 5 p.
- 179.Szajewska, H. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials / H. Szajewska, J.Z. Mrukowicz // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* - 2001. - Vol. 33, № 2. - P. S17-25.
- 180.Tamang, J.P. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas / J.P. Tamang, B. Tamang, U. Schillinger // *International journal of food microbiology.* - 2009. - Vol. 135. - P. 28-33.

181. Tan, Q. Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough / Q. Tan, H. Xu, Z.P. Aguilar, S. Peng, S. Dong // Journal of food science. - 2013. - Vol. 78, № 4. - P. M587-M593.
182. Tannock, G.W. Comparison of the compositions of the stool microbiotas of infants fed goat milk formula, cow milk-based formula, or breast milk / G.W. Tannock, B. Lawley, K. Munro, S. Pathmanathan, S.J. Zhou, M. Makrides, R.A. Gibson // Applied Environmental Microbiology. - 2013. - Vol. 79, № 9. - P. 3040-3048.
183. Teixeira, L.M. Enterococcus / L.M. Teixeira, M.G. Carvalho, R.R. Facklam // Manual of clinical microbiology: editors Murray B.E., Baron E.J., J.H. Jorgensen. - Washington, DC: ASM. - 2007. - P. 17-26.
184. Thompson, C. *Lactobacillus acidophilus* sepsis in a neonate / C. Thompson, Y.S. McCarter, P.J. Krause // Journal of Perinatology. - 2001. - Vol. 21. - P. 258–260.
185. Tomida, S. Pan-genome and comparative genome analyses of propionibacterium acnes reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome / S. Tomida, L. Nguyen, B.H. Chiu, J. Liu, E. Sodergren, G.M. Weinstock, H. Li // mBio. - 2013. - Vol. 4, № 3. - P. 3-13.
186. Turnbaugh, P.J. A core gut microbiome in obese and lean twins / P.J. Turnbaugh, M. Hamady, T. Yatsunencko, B.L. Cantarel, A. Duncan, R.E. Ley, M.L. Sogin, W.J. Jones, B.A. Roe, J.P. Affourtit, M. Egholm, B. Henrissat, A.C. Heath, R. Knight, J.I. Gordon // Nature. - 2009. - Vol. 457, № 7228. - P. 480-484.
187. Turnbaugh, P.J. Human health and disease in a microbial world / P.J. Turnbaugh, A. Stintzi // Frontiers in Microbiology. - 2011. - Vol. 2, № 190.
188. Turnbaugh, P.J. The human microbiome project / P.J. Turnbaugh, R.E. Ley, M. Hamady, C.M. Fraser-Liggett, R. Knight, J.I. Gordon // Nature. - 2007. - Vol. 449. - P. 804-810.
189. Twetman, S. Probiotics for caries prevention and control / S. Twetman, M.K. Keller // Advances in dental research. - 2012. - Vol. 24, № 2. - P. 98-102.
190. van de Groep, K. Development and first evaluation of a novel multiplex real-time PCR on whole blood samples for rapid pathogen identification in critically ill patients with sepsis / K. van de Groep, M. Bos, P. Savelkoul // European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. - 2018. - Vol. 37, № 7. - P. 1333-1344.
191. Vandenplas, Y. Probiotics and prebiotics in infants and children / Y. Vandenplas, E. De Greef, T. Devreker, G. Veereman-Wauters, B. Hauser // Current Infectious Disease Reports. - 2013. - Vol. 15, № 3. - P. 251-262.

192. Vankerckhoven, V. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project / V. Vankerckhoven, G. Huys, M. Vancanneyt // Trends in Food Science and Technology. - 2008. - Vol. 19. - P. 102-114.
193. Varughese, C.A. Antibiotic-associated diarrhea: a refresher on causes and possible prevention with probiotics--continuing education article / C.A. Varughese, N.H. Vakil, K.M. Phillips // Journal of pharmacy practice. - 2013. - Vol. 26, № 5. - P. 476-482.
194. Vujic, G. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study / G. Vujic, K.A. Jajac, S.V. Despot // European journal of obstetrics, gynecology and reproductive biology. - 2013. - Vol. 168, № 1. - P. 75-79.
195. Wang, Z. Inhibitory influence of *Enterococcus faecium* on the propagation of swine influenza A virus in vitro / Z. Wang, W. Chai, M. Burwinkel, S. Twardziok, P. Wrede, C. Palissa, B. Esch, M.F. Schmidt // PLoS One. - 2013. - Vol. 8, № 1. - P. e53043.
196. Wasfi, R. Probiotic *Lactobacillus spp.* inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans* / R. Wasfi, O.A. Abd El-Rahman, M.M. Zafer, H.M. Ashour // Journal of cellular and molecular medicine. - 2018. - Vol. 22, № 3. - P. 1972-1983.
197. Wessels, S. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation / S. Wessels, L. Axelsson, E.B. Hansen, L. De Vuyst, S. Laulund // Trends in Food Science and Technology. - 2004. - № 15. - P. 498-505.
198. Wu, C.C. Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation / C.C. Wu, C.T. Lin, C.Y. Wu, W.S. Peng, M.J. Lee, Y.C. Tsai // Molecular oral microbiology. - 2015. - Vol. 30, № 1. - P. 16-26.
199. Xiraphi, N. Safety study of an antimicrobial peptide lactocin 160, produced by the vaginal *Lactobacillus rhamnosus* / N. Xiraphi, M. Georgalaki, G.V. Driessche, M.L. Chikindas // Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. - 2007. - Vol. ID78248, 6 p.
200. Yamamoto-Hanada, K. Influence of antibiotic use in early childhood on asthma and allergic diseases at age 5 / K. Yamamoto-Hanada, L. Yang, M. Narita, H. Saito, Y. Ohya // Annals of allergy, asthma and immunology. - 2017. - Vol. 119. - P. 54-58.
201. Yamashiro, Y. Beneficial microbes for premature infants, and children with malignancy undergoing chemotherapy / Y. Yamashiro, S. Nagata // Beneficial microbes. - 2010. - Vol. 1, № 4. - P. 357-364.
202. Yermolenko, E. Influence of synthetic peptide inducers on antibacterial activity of enterococci / E. Yermolenko, A. Chernysh, A. Kolobov, A. Suvorov // Beneficial Microbes. - 2011. - Vol. 2, № 1. - P. 9-13.

203. Yeruva, T. Vaginal lactobacilli profile in pregnant women with normal and abnormal vaginal flora / T. Yeruva, H. Rajkumar, V. Donugama // *The indian journal of medical research*. - 2017. - Vol. 146, № 4. - P. 534-540.
204. Yeung, C.Y. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model / C.Y. Yeung, W.T. Chan, C.B. Jiang, M.L. Cheng, C.Y. Liu, S.W. Chang, J.S. Chiang Chiau, H.C. Lee // *PloS One*. - 2015. - Vol. 10, № 9. - P. e0138746.
205. Yu, J. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China / J. Yu, W. Gao, M. Qing, Z. Sun, W. Wang, W. Liu, L. Pan, T. Sun, H. Wang, N. Bai, H. Zhang // *The journal of general and applied microbiology*. - 2012. - Vol. 58, № 3. - P. 163-172.
206. Zhang, L. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions / L. Zhang, S. Davies // *Genome medicine*. - 2016. - Vol. 8, № 1. - P. 1-18.
207. Zou, S. Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer / S. Zou, L. Fang, M. Lee // *Gastroenterology reports (Oxford)*. - 2018. - Vol. 6, № 1. - P. 1-12.