

МИКРООРГАНИЗМЫ ПРОБИОТИКОВ И ИНДИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ: ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПЛОТНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ*

Чичерин И.Ю.¹, Погорельский И.П.², Лундовских И.А.², Бессолицына Е.А.², Дармов И.В.², Шабалина М.Р.²

¹ Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад, Россия (141306, Сергиев Посад-6 МО, ул. Октябрьская, 19-3), e-mail: rpatron@mail.ru

² ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, Россия (610000, Киров, ул. Московская, 36), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

PROBIOTIC MICROORGANISMS AND INDIGENOUS MICROORGANISMS OF HUMANS AND LABORATORY ANIMALS: TYPE OF INTERRELATION AT CO-CULTIVATION ON AGAR NUTRIENT MEDIUM

Chicherin I.Yu.¹, Pogorelsky I.P.², Lundovskikh I.A.², Bessolitsyna E.A.², Darmov I.V.², Shabalina M.R.²

¹ Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad, Russia (Oktyabrskaya st., 19-3, Sergiev Posad-6, Russia, 141306), e-mail: rpatron@mail.ru,

² Vyatka State University, Kirov, Russia (Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

РЕЗЮМЕ

Изучены взаимоотношения 23 коммерческих пробиотических препаратов с клиническими изолятами, выделенными из кишечной микрофлоры больных людей. В 67 случаях взаимодействие между пробиотическими микроорганизмами и клиническими изолятами характеризовались бионесовместимостью по типу «пробиотик против хозяина».

В условиях попарного совместного культивирования на плотной питательной среде бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий, выделенных из фекалий мышей линии BALB/c и C₅₇ Black, около половины изолятов проявили бионесовместимость, что характеризует индивидуальность индигенной микрофлоры.

Аналогичные исследования проведены с использованием 26 изолятов бифидобактерий, 28 изолятов лактобактерий и 19 изолятов эшерихий из кишечного содержимого 23 разных людей. Выраженной антагонистической активностью обладали 13 изолятов лактобактерий, 9 изолятов бифидобактерий и 6 изолятов эшерихий.

Антагонистические взаимоотношения между индигенными бифидобактериями, лактобактериями и эшерихиями, выделенными из одного биотопа разных здоровых людей, зависят от источника выделения и индивидуальных особенностей микробных культур.

Ключевые слова: пробиотики, индигенная микрофлора человека и лабораторных животных, бионесовместимость, мыши линии BALB/c и C₅₇ Black.

ВВЕДЕНИЕ

Организм взрослого человека обильно заселен различного вида микроорганизмами, из числа которых более 60 % колонизируют кишечник [1-3]. Многообразие видового состава кишечной микрофлоры и ее взаимо-

SUMMARY

Interrelations between 23 commercial probiotic preparations and clinical isolates from intestinal microflora of patients were studied. In 67 cases, the interrelations between probiotic microorganisms and clinical isolates were characterized by the type of bioincompatibility «probiotic against host» (growth suppression of indigenous isolates).

At pairwise co-cultivation on agar nutrient medium Bifidobacteria, Lactobacilli and Escherichia isolated from the feces of mice BALB/c and C₅₇ Black lines, about half of isolates showed bioincompatibility that characterizes individuality of indigenous microflora.

Similar studies were performed using 26 isolates of Bifidobacteria, 28 isolates of Lactobacteria and 19 isolates of Escherichia from intestinal contents of 23 different people. 13 isolates of Lactobacteria, 9 isolates of Bifidobacteria and 6 isolates of Escherichia possessed evident antagonistic activity. Antagonistic interrelations between the indigenous Bifidobacteria, Lactobacteria and Escherichia isolated from the same biotope of different healthy people depend on the source of isolation and individual characteristics of microbial cultures.

Key words: probiotics, indigenous microflora of humans and laboratory animals, bioincompatibility, mice of BALB/c and C₅₇ Black lines.

действие со сложно организованной структурой внутренней поверхности слизистой оболочки кишечника явились основанием объединения микроорганизмов и стенки кишечника в единый микробно-тканевой комплекс [4-6].

* Ссылка для цитирования: Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Бессолицына Е.А., Дармов И.В., Шабалина М.Р. Микроорганизмы пробиотиков и индигенной микрофлоры человека и животных: характер взаимодействия при совместном культивировании на плотной питательной среде. Журнал Международной Медицины. - 2013. - №1(2). - С. 122-130.

Функционирование единого микробно-тканевого комплекса обусловлено не только работой кишечника, находящегося под постоянным нейро-гуморальным контролем, но и межклеточными взаимодействиями в микробных популяциях.

Количественное соотношение видов микрофлоры является важной характеристикой микробиоценоза кишечника. Одни виды встречаются редко, другие – часто, определяя облик микробиоценоза. Доминирующими в составе микробного сообщества являются анаэробные и микроаэрофильные группы микроорганизмов. Именно они составляют «видовое ядро» микробиоценоза, формируя среду обитания для всего сообщества.

Однако редкие и малочисленные виды важны для жизнедеятельности микробного сообщества: они создают его видовое разнообразие, увеличивают количество биоценологических связей, служат резервом для наполнения и замещения доминирующих, т.е. придают микробиоценозу устойчивость в разных условиях [7, 8].

Как только происходит рассогласование взаимоотношений между микрофлорой и слизистой оболочкой и развитие вследствие этого микрoэкологических нарушений в кишечнике, наступает расстройство пищеварения, нарушение функции детоксикации и выведения токсических веществ, нарушение эндо- и экзосекреторной регуляции гомеостаза, кроветворения, иммунной защиты [9].

Как свидетельствуют данные клинико-лабораторных исследований, у значительной части населения России имеет место выраженный дисбаланс кишечной микрофлоры, который увеличивает рост числа заболеваний, в разной степени связанных с этими нарушениями [6, 7, 10, 11].

Для коррекции и восстановления численности и качественного состава кишечной микрофлоры на протяжении длительного периода используют пробиотики – живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при энтеральном пути поступления благоприятные эффекты на физиологические функции, биохимические и поведенческие реакции организма через оптимизацию микрoэкологического состояния кишечника [12, 13].

Однако, наблюдается явное несоответствие между сложившимся представлением об эффективности пробиотиков и растущим распространением дисбактериозов [10, 14, 15].

Возможные причины недостаточной эффективности пробиотиков при дисбиотических нарушениях кишечной микрофлоры указаны в работах [10, 16], в которых одной из главных выделена чужеродность пробиотических микроорганизмов для пациентов, которым они предназначались [17]. Более того, даже использование сертифицированных пробиотиков может не только не дать положительного результата, но и вызвать ухудшение состояния пациента [7, 8].

Важнейшим фактором, определяющим положительный или побочный эффекты, сроки приживления или элиминации пробиотических микроорганизмов, является, по мнению Н.А. Глушановой и Б.А. Шендерова [10], колонизационная резистентность слизистой оболочки кишечника. В свою очередь, колонизационная резистентность связана с биологическими свойствами пробиотических микроорганизмов и индигенными представителями кишечной микрофлоры, которые определяют характер взаимоотношений между ними – совместимость или конкурентность.

В проведенных исследованиях по оценке взаимоотношений лактобацилл, входящих в состав коммерческого пробиотического препарата «Наринэ», и индигенных лактобацилл человека и животных при их совместном

выращивании на плотной питательной среде авторами цитируемой работы [10] было выявлено 3 типа взаимоотношений: биосовместимость (отсутствие антагонизма), бионесовместимость по типу «пробиотик против хозяина» (подавление роста индигенных лактобацилл), бионесовместимость по типу «хозяин против пробиотика» (угнетение роста пробиотических бактерий).

Основной вывод, который сделали авторы, изучив в опытах *in vitro* 556 культур индигенных лактобацилл, состоит в том, что взаимоотношения индигенных лактобацилл, изолированных из различных биотопов одного хозяина, из одного биотопа различных хозяев, а также между отдельными штаммами разных видов при совместном культивировании на плотной питательной среде зависят от индивидуальных особенностей культур, а также видовой специфичности хозяина и биотопа, из которого получены культуры.

С учетом экспериментальных данных о возможности антагонизма между пробиотическими штаммами лактобактерий и бифидобактерий и собственной микрофлорой кишечника [18], в результате чего происходит элиминация пробиотических бактерий из организма нового хозяина после прекращения их применения [19], было целесообразно провести более расширенные исследования по оценке взаимоотношений между различными категориями пробиотических микроорганизмов в экспериментах *in vitro*.

Цель исследования – изучение взаимоотношений микроорганизмов, входящих в состав коммерческих пробиотических препаратов, с микроорганизмами, выделенными из кишечного содержимого людей и животных, при их совместном культивировании на плотных питательных средах.

Материалы и методы исследования

В экспериментах исследовали 23 коммерческих пробиотических препарата, характеристика которых и видовой состав микроорганизмов представлены в таблице 1. В таблице 1 приведен также перечень выделенных от людей микроорганизмов для изучения взаимоотношений с коммерческими пробиотическими препаратами и входящими в их состав производственными штаммами пробиотических микроорганизмов.

Выделение микроорганизмов индигенной микрофлоры из кишечного содержимого здоровых людей и от мышей линии BALB/c [20] и линии C₅₇ Black [21], определение их видовой принадлежности, проводили согласно рекомендациям работы [10]. Выделенные от людей с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта изоляты микроорганизмов были использованы для изучения симбиотических или конкурентных взаимоотношений с входящими в состав коммерческих пробиотических препаратов производственными штаммами микроорганизмов, выполненного в соответствии с описанным в работе [22] методом.

Оценку биосовместимости индигенных микроорганизмов, выделенных из фекалий людей и линейных мышей путем совместного попарного культивирования бактерий на плотной питательной среде, проводили по разработанной Н.А. Глушановой и Б.А. Шендеровым методике [10].

Культуры считали биосовместимыми в случае обнаружения роста двух исследуемых попарно культур, сходного с ростом в контроле. При задержке или отсутствии роста одной из культур (при росте контрольных) взаимоотношения между ними рассматривались как антагонистические, а культуры считали бионесовместимыми [10].

Выращивание микроорганизмов проводили на питательных средах рекомендованного состава [10, 23, 24], а также на агаре Хоттингера и агаре Эндо. При выращи-

вании пробиотических микроорганизмов в микроаэрофильных условиях использовали систему для анаэробно-го культивирования Anaerobic system Mark III – LE003 (Hi

Media Laboratories Pvt. Ltd. Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными Hi Anaero Gas Pacet.

Таблица 1.

Взаимоотношения коммерческих пробиотических препаратов с клиническими изолятами микроорганизмов, выделенных из фекалий больных людей											
№ п/п	Название препарата, серия	Фирма (предприятие) и страна изготовитель	Видовой состав микроорганизмов и их содержание	Тип взаимодействия с микроорганизмами							
				<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>B. mesentericus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. faecium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>B. ureoliticus</i>	<i>K. planticola</i>
1	Ацилакт, 040211	ЗАО «Фирма «Витафарма», Россия	<i>L. acidophilus</i> 100 аш; <i>L. acidophilus</i> НК ₁ ; <i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄ ; в 1 таблетке 1·10 ⁷ бактерий	н	н	н	н	н	с	с	н
2	Аципол, 08	ЗАО «Фармацевтическая фирма «ЛЕККО», Россия	<i>Lactobacillus</i> sp., в 1 капсуле 1·10 ⁷ бактерий	с	н	н	с	с	с	с	н
3	Бактисубтил, 0492	ЗАО «ФармФирма «Сотекс», Россия	<i>B. cereus</i> IP 5832; в 1 капсуле 35 мг субстанции	с	н*	с	с	с	н*	с	н*
4	Биоспорин, 149-0805	Филиал ФГУ 48 ЦНИИ МО РФ - ЦВТП БЗ, Россия	<i>B. subtilis</i> 3, <i>B. licheniformis</i> 31; в 1 дозе 1·10 ⁹ бактерий	н*	н*	н	н	н	с	н*	н
5	Бифидумбактерин, 315-6	ФГУП «НПО «Микроген»; Россия	<i>B. bifidum</i> № 1 или № 791; в 1 дозе 1·10 ⁷ бактерий	н*	н	с	с	с	с	с	н*
6	Бифидумбактерин форте, 16-40311	ЗАО «Партнер», Россия	<i>B. bifidum</i> № 1; в 1 пакете 5·10 ⁷ бактерий	с	с	н	с	с	с	с	н*
7	Бифилиз (ВИ-ГЭЛ), 50	ООО «Фирма «Фермент», Россия	<i>B. bifidum</i> № 1; в 1 дозе 1·10 ⁷ бактерий	с	н	с	с	с	с	с	н
8	Бификол, 15/4	ФГУП «НПО «Микроген», Россия	<i>B. bifidum</i> № 1, <i>E. coli</i> М-17; в 1 дозе 1·10 ⁷ бактерий	с	н	н	с	с	с	с	н*
9	Бифистим лакто, 1201	ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> ; в 1 г порошка 1·10 ⁸ бактерий	н	н	с	с	с	с	с	н*
10	Бифиформ, 226106	«Ферросан А/С», Дания	<i>B. longum</i> , <i>E. faecium</i> ; в 1 капсуле 1·10 ⁷ бактерий	н	н	с	с	с	с	с	с
11	Бифиформ (комплекс) № 30, 227377	«Ферросан А/С», Дания	<i>Bifidobacterium</i> BB TM 1·10 ⁹ КОЕ, <i>L. rhamnosus</i> GG 1·10 ⁹ КОЕ; <i>L. acidophilus</i> LA-5 2·10 ⁸ КОЕ в 1 таблетке	н	н	с	с	н	н*	н*	н*
12	Бифолак, 7950125	«Бифодан А/С ДК-3390», Дания	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. longum</i> без указания количественного содержания в капсуле	н	н	н	с	с	с	с	н*
13	Колибактерин, 813-20311	ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия	<i>E. coli</i> М-17; в 1 дозе 10·10 ⁹ бактерий	с	н*	н	н	с	с	с	с
14	Лактобактерин, 15/6	ФГУП «НПО «Микроген», Россия	<i>L. plantarum</i> 8Р-А3 (возможны <i>L. plantarum</i> 38, <i>L. fermentum</i> 90Т-С4, <i>L. fermentum</i> 39); в 1 дозе 2·10 ⁹ бактерий	н	н	с	с	с	н	с	с
15	Линекс, ВФ 9149	Лек g.g., Словения	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>E. faecium</i> ; в 1 капсуле 280 мг. В 1 г порошка Либенин по 300 мг каждого из микроорганизмов	н	н	с	с	с	н*	н*	н*
16	Наринэ, СДС. 500051	ООО «НАРЭКС», республика Армения	<i>L. acidophilus</i> n.v. Ер 317/402; в 1 капсуле 100 мг лиофилизированной культуры	н	н	с	с	с	с	н	н*
17	Нормобакт (пробиотик + пребиотик), 298492	Chr. Hansen A/S, Дания, Медана Фарма А.О., Польша	<i>L. acidophilus</i> (La-5), <i>Bifido-bacterium</i> (BB-12); в 1 саше 4·10 ⁹ бактерий + фруктозоолигосахариды	н	н	с	с	н	с	с	с
18	Биокомплекс «Нормофлорин-Б1», 0411	ООО «НПП Бифилюкс+», Россия	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> ; в 1 мл 1·10 ¹⁰ бактерий	н	н	с	н	н	с	н	н
19	Биокомплекс «Нормофлорин-Д», 0407	ООО «НПП Бифилюкс+», Россия	<i>L. casei</i> 1·10 ⁹ , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> ; 1·10 ⁸ бактерий в 1 мл	н	н	н	н	н	с	н	н
20	Биокомплекс «Нормофлорин-Л», 0410	ООО «НПП Бифилюкс+», Россия	<i>L. acidophilus</i> ; в 1 мл 1·10 ⁹ бактерий	н	н	с	с	н	с	с	с
21	Примадофилус Бифидус, 77.99.23.2 У 2809.4.09	Нейчерс Вэй Продактс, Инк., США	<i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> ; в 1 капсуле 3,9·10 ⁹ бактерий	н	н	с	с	н	с	с	с
22	Пробифор, 2-10211	ЗАО «Партнер», Россия	<i>B. bifidum</i> № 1; 5·10 ⁸ бактерий в порошке 1 пакета	н	н	с	с	с	с	н*	н*
23	Споробактерин жидкий, суспензия для приема внутрь, 311110	ООО «Бакорен», Россия	<i>B. subtilis</i> 534; в 1 мл 1·10 ⁹ КОЕ	н	н	с	с	н	с	н	н*

Примечание: «с» – биосовместимость; «н» – бионесовместимость; «н*» – бионесовместимость с экспансивным ростом пробиотического микроорганизма

Результаты исследования

В выполненных Н.А. Глушановой и Б.А. Шендеровым исследованиях [10] с использованием штамма лактобацилл *L. acidophilus* Ер 317/402, выделенного из пробиотического препарата «Наринэ», и 335 культур свежевыведенных лактобацилл человека при их совместном культивировании на плотной питательной среде биосовместимость микроорганизмов была выявлена в 15,2 % случаев, бионесовместимость по типу «пробиотик против хозяина» – в 62,3 % случаев и бионесовместимость по типу «хозяин против пробиотика» – в 22,5 % случаев.

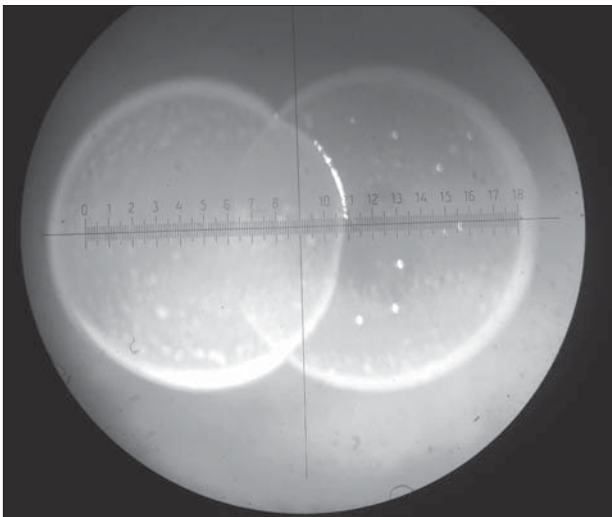
В настоящей работе пробиотик «Наринэ» наряду с 22 другими коммерческими пробиотическими препаратами были протестированы на биосовместимость с 8 клиническими изолятами микроорганизмов, выделенных из фекалий больных с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Пробиотические препараты отличались один от другого как по биотехнологии получения и форме выпуска, так и по количественному и видовому составу микроорганизмов. Результаты определений представлены в таблице 1.

Из представленных в таблице 1 результатов следует, что в 94 случаях (51,1 %) взаимодействие коммерческих пробиотических препаратов с микроорганизмами клинических изолятов характеризовалось биосовместимостью, в 67 случаях (36,4 %) – бионесовместимостью по типу «про-

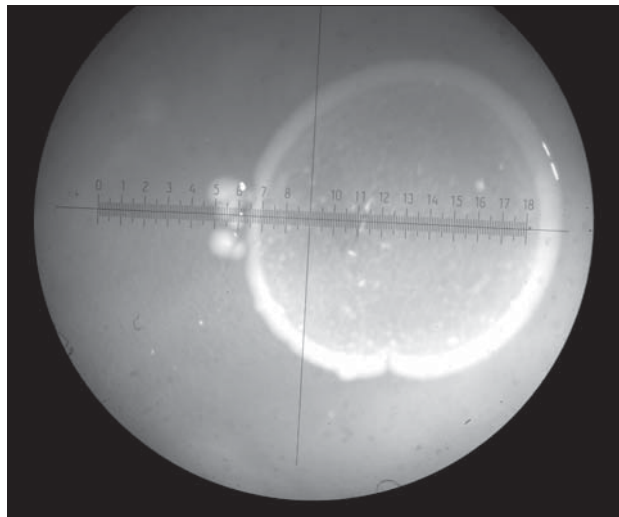
биотик против хозяина» с формированием различной выраженности зон ингибирования роста микроорганизма хозяина, и в 23 случаях (12,5 %) – бионесовместимостью по типу «пробиотик против хозяина» с экспансивным ростом пробиотических микроорганизмов, чего в опытах Н.А. Глушановой и Б.А. Шендерова [10] отмечено не было.

В целом, как это видно из данных, приведенных в таблице 1, взаимодействие сравниваемых микроорганизмов в 51,1 % случаев носило характер биосовместимости, а в 48,9 % случаев – бионесовместимости с ингибированием роста бактерий хозяина или с экспансивным ростом пробиотических микроорганизмов. Бионесовместимости по типу «хозяин против пробиотика» не было выявлено ни в одном случае.

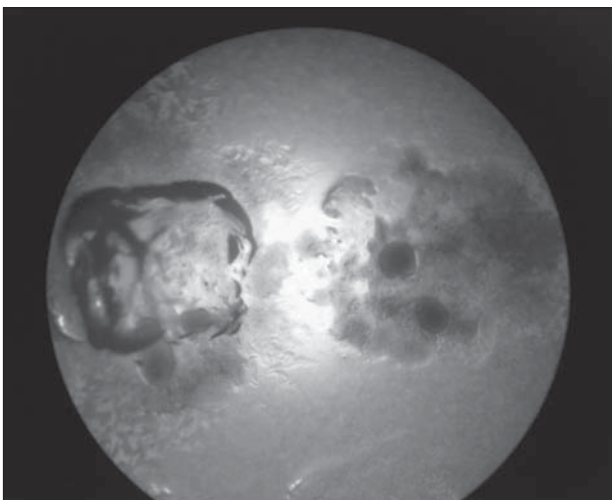
В следующей серии экспериментов были использованы бифидобактерии, лактобактерии и эшерихии, выделенные из фекалий мышей линии BALB/c и линии C₅₇ Black одного помета [20, 21]. Мыши обеих указанных линий отличаются друг от друга не только своим поведением: более агрессивными являются мыши линии C₅₇ Black. В то же время от мышей линии BALB/c чаще всего (примерно в 35% случаев) из фекалий выделяются культуры микроорганизмов в сочетании с протеом (*P. mirabilis*). Именно культуры протея, выделенные из фекалий мышей линии BALB/c, во всех случаях подавляли рост индигенной микрофлоры кишечника мышей линии C₅₇ Black.



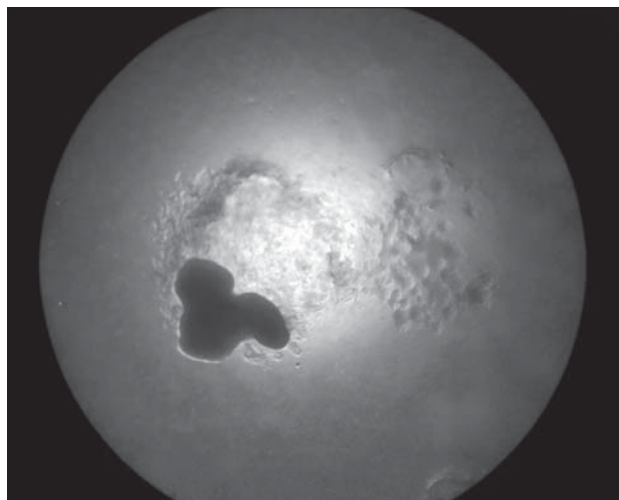
1



2



3



4

Рисунок – Микрофотографии биосовместимых (1, 3) и бионесовместимых (2, 4) культур лактобактерий при постановке теста с бульонными культурами (1, 2; x10) и методом отпечатков колоний (3, 4; x100)

Всего из фекалий мышей линии BALB/c и C₅₇ Black было выделено по 15 культур бифидобактерий, по 16 культур лактобактерий и по 10 культур эшерихий. Поскольку животные каждой линии были одного помета, в фекалиях от них обнаруживали бифидобактерии, лактобактерии и эшерихии одной таксономической принадлежности, в частности *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei* и лактозонегативные эшерихии.

При оценке биосовместимости микроорганизмов, выделенных от мышей линии BALB/c, при их совместном попарном культивировании на плотных питательных средах по методу Н.А. Глушановой и Б.А. Шендерова [10] было обнаружено, что все бифидобактерии и эшерихии, выделенные от разных животных, оказались биосовместимыми. Из 16 культур лактобактерий три подавляли рост лактобактерий, выделенных из фекалий разных животных, проявляя бионесовместимость. На рисунке приведены фотографии культур с разным типом взаимодействия при совместном выращивании на плотной питательной среде.

Индигенные культуры бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий, выделенные от мышей линии C₅₇ Black, оказались биосовместимыми как в пределах одного вида, так и при межвидовом тестировании.

Последующее изучение взаимодействия культур микроорганизмов, выделенных от мышей линии C₅₇ Black и линии BALB/c между собой в процессе их попарного культивирования на плотной питательной среде, показало следующее: из 15 изолятов бифидобактерий, выделенных из фекалий мышей линии C₅₇ Black, 8 выявили бионесовместимость с бифидобактериями, выделенными из фекалий мышей линии BALB/c; из 16 соответствующих изолятов лактобактерий от мышей линии C₅₇ Black 6 проявили бионесовместимость с лактобактериями от мышей линии BALB/c; из 10 соответствующих изолятов эшерихий от мышей линии C₅₇ Black 4 проявили бионесовместимость с эшерихиями от мышей линии BALB/c.

Таким образом, на взаимоотношения между бифидобактериями, лактобактериями и эшерихиями, выделенными из одного биотопа, но разных животных, оказывают влияние факторы, связанные с организмом хозяина.

Весьма интересные результаты получены при совместном культивировании на плотной питательной среде свежесвыделенных индигенных бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий из кишечника человека с теми же бактериальными видами, выделенными от мышей линии C₅₇ Black.

Те же изоляты, которые проявили бионесовместимость с представителями индигенной микрофлоры — бифидобактериями, лактобактериями и эшерихиями мышей линии BALB/c, оказались бионесовместимыми с представителями кишечной микрофлоры, выделенными из одного биотопа разных людей. В то же время лишь единичные бифидобактерии, лактобактерии и эшерихии, выделенные из фекалий мышей линии BALB/c, оказались несовместимыми с изолятами соответствующих видов бактерий, выделенных из фекалий людей.

Всего в исследованиях по оценке биосовместимости изолятов индигенной микрофлоры, выделенных из одного биотопа 23 разных людей, было протестировано 26 изолятов бифидобактерий (*B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*), 28 изолятов лактобактерий (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*), 19 изолятов эшерихий (17 лактозонегативных изолятов и 2 гемолитических изолята).

Структура основных видов микроорганизмов в составе кишечной микрофлоры соответствует таковой у лиц средней и старшей возрастных групп [11]. Исследование 26 культур бифидобактерий показало, что при совмест-

ном их выращивании попарно на плотной питательной среде 9 культур (34,6 %) проявили бионесовместимость различной выраженности (угнетение или ингибирование роста, экспансивный рост).

Из 28 исследованных культур лактобактерий у 13 (46,4 %) наблюдали четкие антагонистические взаимоотношения, проявившиеся либо угнетением роста парной культуры лактобактерий с формированием разной степени выраженности зоны задержки роста, либо экспансивным ростом одной из культур.

Из 19 изолятов эшерихий у 6 (31,6 %), в том числе у двух гемолитических изолятов, при совместном попарном выращивании выявились бионесовместимые (антагонистические) взаимоотношения. В таблице 2 в обобщенном виде представлены результаты оценки взаимоотношений микроорганизмов индигенной микрофлоры людей, выделенных из одного биотопа.

Сопоставляя представленные в таблице 2 результаты, касающиеся взаимоотношения лактобактерий, выделенных из одного биотопа разных людей, с результатами, полученными Н.А. Глушановой и Б.А. Шендеровым [10] при аналогичном изучении изолятов лактобактерий кишечного происхождения, тоже выделенных от разных людей, можно утверждать, что среди лактобактерий антагонистические взаимоотношения различной выраженности встречаются от 23 % до 46 % случаев. Среди выделенных нами бифидобактерий и эшерихий кишечного происхождения бионесовместимость внутри пула указанных микроорганизмов составляет 34,6 % и 31,6 % соответственно.

Таким образом, проведенные исследования дают основание говорить о том, что выделенные от различных людей основные представители нормальной кишечной микрофлоры при их совместном выращивании проявляют разнонаправленные — как антагонистические, так и нейтральные (биосовместимые) взаимоотношения.

Обсуждение полученных результатов

В выполненных нами исследованиях по изучению выживаемости пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных было установлено, что вводимые перорально пробиотические микроорганизмы обнаруживаются в фекалиях животных на 2 сутки эксперимента. Однако после окончания их перорального введения уже через 3 суток они перестают обнаруживаться в фекалиях животных [23].

Среди ряда факторов значительное влияние на приживание пробиотика в организм нового хозяина могут оказать генетически обусловленные факторы. В частности, показано, что формирование видовой, индивидуальной, тканевой специфичности резидентной микрофлоры тесно связано с иммуногенетическими взаимодействиями внутри микробно-тканевого комплекса, которые приводят к развитию индивидуальной иммунологической толерантности [5, 24, 25].

При этом важно подчеркнуть, что на формирование индивидуальной резидентной микрофлоры влияет система гистосовместимости, которая в свою очередь определяет специфичность рецепторов для адгезии бактерий нормальной (резидентной) микрофлоры. Результатом последовательной череды указанных событий является становление собственных резидентных микробных ассоциаций на генетически индивидуальном для каждого человека субстрате слизистых оболочек [26, 27].

Микроорганизмы нормальной кишечной микрофлоры, по-видимому, наряду с видовой специфичностью обладают индивидуальной специфичностью организма хозяина, что проявляется антагонизмом между производственными штаммами лактобацилл и бифидобактерий

Таблица 2.

Взаимоотношения микроорганизмов кишечной микрофлоры, выделенных от разных людей, при совместном культивировании попарно на плотной питательной среде			
Микроорганизмы	Тип взаимодействия микроорганизмов ... при совместном культивировании <i>in vitro</i>		
	Всего	Биосовместимые	Бионесовместимые
Бифидобактерии (<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i>)	26	17	9
Лактобактерии (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i>)	28	15	13
Эшерихии (<i>E. coli</i> : лактозонегативные и гемолитические)	19	13	6

и резидентной микрофлорой кишечника [18]. Именно с антагонизмом резидентной микрофлоры связана, как это указано в работе [19], элиминация пробиотических бактерий из организма нового хозяина после прекращения их применения, что и было показано нами в прямых экспериментах на животных [23].

На основании собственных экспериментальных данных, полученных *in vitro*, Н.А. Глушанова и Б.А. Шендеров [10] высказали предположение о том, что и в условиях *in vivo* при энтеральном (вагинальном или ректальном) введении больших концентраций пробиотических лактобацилл последние могут вызвать дисбаланс в индигенной лактофлоре хозяина.

В наших исследованиях количество изученных коммерческих пробиотических препаратов составило 23, включая пробиотик «Наринэ» (республика Армения), микроорганизмы которого *L. acidophilus* Ер 317/402 были использованы в экспериментах Н.А. Глушановой и Б.А. Шендера [10] и по результатам которых авторами были предложены типы взаимодействия пробиотических лактобактерий с лактобактериями, выделенными из кишечного содержимого разных людей.

В количественном отношении в 48,9 % случаев исследованные нами пробиотики проявили антагонистические свойства по отношению к микроорганизмам, выделенным от людей с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Биосовместимость пробиотиков в 51,1% случаев с выделенными культурами наводит на мысль о том, что у половины назначаемых с лечебной или профилактической целью пробиотиков их потенциал реализован не будет и эффект от пробиотикотерапии может оказаться нулевым.

Характеризуя взаимодействие представителей индигенной микрофлоры (бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий) кишечника мышей линии BALB/c и линии C₅₇/Black, можно в целом назвать его симбиотическим (биосовместимым), за исключением культур протей (*P. mirabilis*) от мышей линии BALB/c, подавляющих рост микроорганизмов, выделенных из кишечника мышей линии C₅₇/Black, а также трех культур лактобактерий от мышей линии BALB/c, проявивших бионесовместимость с аналогичными культурами, выделенными из фекалий разных животных той же линии.

Высокий уровень биосовместимости *in vitro* представителей кишечной микрофлоры, выделенных из фекалий мышей линий BALB/c и C₅₇/Black, можно связать с совместным содержанием животных хоть и в разных клетках, но в пределах одного помещения вивария.

Проводя третью серию экспериментов по изучению взаимодействия важнейших представителей кишечной микрофлоры, выделенных из одного биотопа, но от разных здоровых людей, мы ориентировались на опубликованные результаты исследований A. Lidbeck et al [28], согласно которым у здоровых взрослых людей, имеющих

уже сформировавшуюся резидентную микрофлору, невозможно ее изменить, назначая пробиотические препараты, содержащие, в частности, лактобациллы.

В основе стабильности консорциума микроорганизмов кишечной микрофлоры лежит индивидуальная конформация поверхностей структур бактерий, ответственных за адгезию к комплементарным рецепторам эпителиоцитов слизистой оболочки кишечника [5]. Углеводы, входящие в состав гликопротеидов муцина, служащего рецептором для фиксации бактерии, генетически предопределены организмом хозяина [29]. При этом генотип хозяина играет существенную роль в становлении генотипически предопределенной специфичности адгезинов бактерий [5, 30].

Эксперименты по совместному культивированию на плотных питательных средах индигенных бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий, выделенных в наших экспериментах из одного биотопа различных хозяев, проявили не менее чем в 30 % случаев (а лактобактерии – в 46,4 % случаев) выраженную бионесовместимость, что, конечно, подчеркивает индивидуальный характер выраженности антагонизма представителей индигенной микрофлоры, который может проявиться *in vivo* как в отношении близкородственных, так и потенциально патогенных бактерий [5].

Свидетельством того, что микроорганизмы индивидуальной кишечной микрофлоры характеризуются видовой, индивидуальной и тканевой специфичностью, являются опубликованные данные [5], согласно которым перорально введенные живые лактобактерии в желудочно-кишечный тракт конвенциональных белых мышей подвергаются рестрикции и удаляются, в то время как у безмикробных животных живые лактобактерии не разрушаются и колонизируют слизистую кишечника.

Весьма вероятно, что выявленный в наших экспериментах *in vitro* антагонизм между микроорганизмами индигенной микрофлоры, выделенными из одного биотопа разных людей, может отражать проявляемое *in vivo* сочетанное действие видовой, тканевой и индивидуальной специфичности микроорганизмов в виде выраженной несовместимости с индигенной микрофлорой нового хозяина и невозможности кардинальной смены микробного пейзажа.

В этой связи важным критерием эффективности существующих производственных пробиотических штаммов и вновь предлагаемых для целей биотехнологии пробиотических препаратов должна рассматриваться их биосовместимость с резидентной микрофлорой потенциального реципиента.

Выводы

1. Исследованы взаимоотношения 23 коммерческих пробиотических препаратов отечественного и зарубежного производства с 8 клиническими изолятами микроорганизмов, выделенных из фекалий людей с различными

заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Установлено, что в 67 случаях взаимоотношение между исследованными коммерческими пробиотическими препаратами и клиническими изолятами микроорганизмов из одного биотопа различных людей носило характер бионесовместимости по типу «пробиотик против хозяина».

2. В условиях попарного совместного культивирования на плотной питательной среде оценена биосовместимость бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий, выделенных из одного биотопа 23 разных здоровых людей. Из 26 изолятов бифидобактерий *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve* 9 (34,6 %) проявили бионесовместимость различной степени выраженности; из 28 изолятов лактобактерий *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* у 13 (46,4 %) наблюдали антагонистические взаимоотношения разной степени выраженности; из 19 изолятов *E. coli* (лактозонегативные и гемолитические) у 6, в том числе у двух гемолитических изолятов, характер взаимоотношений был антагонистическим.

3. Бионесовместимые (антагонистические) взаимоотношения между исследованными бифидобактериями, лактобактериями и эшерихиями, выделенными из кишечного содержимого здоровых людей, проявлялись либо угнетением роста парной культуры разной интенсивности, либо экспансивным ростом одной из тестируемых культур.

4. При оценке биосовместимости 15 изолятов бифидобактерий *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, 16 изолятов лактобактерий *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, 10 изолятов лактозонегативных эшерихий, выделенных из кишечного содержимого мышей линии BALB/c и мышей линии C₅₇ Black, в условиях совместного попарного культивирования на плотной питательной среде было установлено, что для 8 изолятов бифидобактерий, 6 изолятов лактобактерий и 4 изолятов эшерихий характерен бионесовместимый тип взаимодействия с различной выраженностью задержки роста парной культуры.

5. Индивидуальные особенности основных представителей индигенной микрофлоры, несущие отпечаток видовой специфичности организма хозяина и биотопа, из которого были выделены микроорганизмы, диктуют необходимость предварительного изучения взаимоотношения микроорганизмов и создаваемых на их основе пробиотических или синбиотических препаратов с микроорганизмами индигенной микрофлоры человека, которому планируется их назначение.

ЛИТЕРАТУРА

- Salminen S., Isolauri E., Onela T. Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy* 1995; 41 (Suppl. 1): 5-15.
- Ардатская М.Д. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции. *Concilium medicum* 2008; 10(8): 86-92.
- Шендеров Б.А. Функциональное и персональное питание. Современное состояние и перспективы. *Журн. ГАСТРОэнтерология Санкт-Петербурга* 2010; (2-3): 2-5.
- Олескин А.В. Надорганизменный уровень взаимодействия в микробных популяциях. *Микробиология* 1993; 62(3): 389-405.
- Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. Том 1: Микрофлора человека и животных и ее функции; М.: Издательство ГРАНТ, 1998; 288 с.
- Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Зверков И.В., Чичерин И.Ю. Дисбактериоз кишечника (понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции). Современные возможности пробиотической терапии: учебно-методическое пособие для врачей и курсантов циклов усовершенствования врачей; М.: ФГУ «Учебно-научный медицинский центр» Управления делами Президента Российской Федерации; 2010; 50 с.
- Воробьев А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины. *Вестник РАМН* 1997; (3): 4-7.

- Бондаренко В.М., Петровская В.Г. Ранние этапы развития инфекционного процесса. *Вестник РАМН* 1997; (3): 7-10.
- Kelly D., Conway S., Aminov R. Commensal gut bacteria: mechanism of immune modulation. *Trends Immunol* 2005; 26: 326-333.
- Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования in vitro. *Журн. микробиол* 2005; (2): 56-61.
- Захаренко С.М., Фоминых Ю.А., Мехтев С.Н. Инфекции, микробиота кишечника человека и метаболический синдром. Эффективная фармакотерапия. *Гастроэнтерология* 2012; 3: 14-20.
- Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: дис... д-ра мед. наук: защищена в 2003 г. / М.Д.Ардатская. – М.: ФБУ «Учебно-научный медицинский центр» Управления делами Президента Российской Федерации; 2003; 299 с.
- Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. Дисбактериоз кишечника: эволюция взглядов. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции. *Concilium medicum. Гастроэнтерология* 2006; (2): 4-18.
- Малахов Ю.А. Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека. *Матер. Всерос. конф. с междунар. участием* 21-23 апреля 1999 г. – М.: 1999; 110.
- Кузнецова Г.Г., Шевелева С.А. Пробиотикограмма – новый подход к коррекции дисбиотических отклонений в микробиоценозе толстой кишки. *Здоровое питание населения России: матер. VII Всерос. конгр. 12-14 ноября 2003 г.*; гл. ред. В.А.Тутельян. – М.: 2003; 270-273.
- Глушанова Н.А. Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника: дис... д-ра мед. наук: защищена в 2006 г. / Н.А.Глушанова. – М.: ФГУН «Московский НИИЭМ им. Г.Н.Габричевского», 2006; 260 с.
- Коршунов В.М., Смянов В.В., Ефимов Б.А. Рациональные подходы к коррекции микрофлоры кишечника. *Вестник РАМН* 1996; (2): 60-65.
- Анохин В.А., Тюрин Ю.А. Роль основных представителей анаэробной кишечной микрофлоры в норме и патологии. *Казанский мед. журн.* 2001; 82(2): 149-151.
- Ефимов Б.А., Коршунов В.М. Использование totally деконтаминированных мышей в условиях общей гнотобиологической изоляции для получения высокоадгезивных штаммов *Streptococcus faecium*. *Журн. микробиол.* 1992; (5-6): 9-11.
- Potter M. History of the BALB/c family. *The BALB/c mouse: Genetic and Immunology. Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 1985; 122: 1-15.
- Осетрова Т.Д., Кондрина Л.П., Евсиков В.И. Роль генетически контролируемых взаимоотношений мать-потомок в становлении воспроизводительной функции мышей. Тезисы докл. 111 съезда генетиков и селекционеров Украины. Киев: Наук. Думка, 1976; (часть 2): 180-181.
- Jorgensen J.H., Turnidge J.D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology.* 9th-ed ASM Press Washington; 2007: 1152-1172.
- Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дурнев Е.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных. *Журн. инфектологии* 2012; 4(1): 68-74.
- Хавкин А.И., Жихарева Н.С. Коррекция дисбиотических изменений кишечника у детей на современном этапе. *Российский мед. журн.* 2004; 12(16): 960-963.
- Van der Waaij D. The apparent role of the mucos membrane and the gut-associated lymphoid tissue in the selection of the normal resident flora of the digestive tract. *Clin. Immunol. News* 1986; 7(1): 4-7.
- Van der Waaij D. The colonization resistance of the digestive tract in different animal species and in man: a comparative study. *Epidemiol. Infect.* 1990; 105(2): 237-243.
- Куваева И.Б. Микроэкологическая система в оценке эффективности биологически активных добавок и продуктов с пробиотическим действием. Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека: Матер. Всерос. конф. с междунар. участием 21-23 апреля. М.: 1999; 18-20.
- Lidbeck A., Gustafson I.A., Nord C.E. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scan J.Infect. Diseases* 1987; 19 (5): 531-537.
- Lenoir-Wijnkoop I. The intestinal microflora. *Understanding the symbiosis* Ed. Mark Aopkins. Danone Vitapole: John Libbey Eurotext. 2003; 48 p.
- Бургасов П.Н., Румянцев С.Н. Антимикробный конституциональный иммунитет. М.: Медицина; 1985; 256 с.