КЛИНИЧЕСКАЯ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЯ clinical gastroenterology



DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-19-24

Перспективы использования антагонистической активности лактобацилл для подавления роста Clostridium (Clostridioides) difficile

Сухина М. А.¹, Шелыгин Ю. А.¹, Жуховицкий В. Г.³, Фролов С. А.¹, Кашников В. Н.¹, Веселов А. В.¹, Луценко С. В.², Чистякова Д. А.¹

- ¹ ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, 123423, Москва, Россия, ул. Саляма Адиля, 2
- ² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия
- ³ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Prospects of using antagonistic activity of lactobacilli to suppress the growth of *Clostridium (Clostridioides) difficile*

M. A. Sukhina¹, Yu. A. Shelygin¹, V. G. Zhukhovitsky³, S. A. Frolov¹, V. N. Kashnikov¹, A. V. Veselov¹, S. V. Lutsenko², D. A. Chistyakova¹

- ¹ State Scientific Center of Coloproctology, 123423, Moscow, Russia, st. Salam Adil 2
- ² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia
- ³ Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health, Moscow, Russia

Для цитирования: Сухина М. А., Шелыгин Ю. А., Жуховицкий В. Г., Фролов С. А., Кашников В. Н., Веселов А. В., Луценко С. В., Чистякова Д. А. Перспективы использования антагонистической активности лактобацилл для подавления роста Clostridium (Clostridioides) difficile. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;160(12): 19–24. DOI: 10.31146/1682-8658-ecq-160-12-19-24

For citation: Sukhina M. A., Shelygin Yu. A., Zhukhovitsky V. G., Frolov S. A., Kashnikov V. N., Veselov A. V., Lutsenko S. V., Chistyakova D. A. Prospects of using antagonistic activity of lactobacilli to suppress the growth of Clostridium (Clostridioides) difficile. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;160(12): 19–24. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-19-24

Жуховицкий Владимир Григорьевич, руководитель лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов

Сухина Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований

Шелыгин Юрий Анатольевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор

Фролов Сергей Алексеевич, заместитель директора по научной работе

Кашников Владимир Николаевич, заместитель директора по лечебной работе

Веселов Алексей Викторович, руководитель отдела по организационной работе и развитию колопроктологической службы

Луценко Сергей Викторович, заведующий кафедрой биотехнологии

Чистякова Дарья Алексеевна, младший научный сотрудник отдела микробиологических и иммунологических исследований

Marina A. Sukhina, PhD, head of department of microbiological and immunological researches, *Scopus Author ID 57192270856*, 36622384800, ORCID https://orcid.org/0000-0003-4795-0751

Yury A. Shelygin, MD, professor, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Director, Scopus Author ID 6602949973, ORCID https://orcid.org/0000-0002-8480-9362

Sergey A. Frolov, MD, deputy director for Science, Scopus Author ID 710906664

Vladimir N. Kashnikov, MD, deputy director for clinical work, Scopus Author ID 6506942235

Alexey V. Veselov, Ph.D. head of organizational work and development coloproctological service

Sergey V. Lutsenko, Dr., professor, head of the department of biotechnology, Scopus Author ID 56012143000, ORCID http://orcid.org/0000-0002-2017-6025

Daria A. Chistyakova, junior researcher of department of microbiological and immunological researches

Резюме

Цель исследования. Изучить антагонистическую активность лактобацилл в отношении клинических штаммов *Clostridium (Clostridioides) difficile*. Материалы и методы: методом двухэтапного культивирования в условиях комбинированной системы (КСК) изучена антагонистическая активность 21 штамма лактобактерий, изолированных из толстокишечного биотопа пациентов в отношении 31 клинического штамма *C. difficile*, изолированных из фекалий пациентов с *C. difficile* — ассоциированной диареей.

Результаты. Лактобациллы, выделенные из кишечного биотопа пациентов, проявляли избирательную антагонистическую активность в отношении *C. difficile*. При этом выделенные штаммы лактобацилл дискриминировались как по спектру антагонистической активности, так и по степени её выраженности, не демонстрируя, какой-либо связи ни с видовой принадлежностью, ни с множественностью своей природной популяции. Были выделены штаммы лактобактерий (*L. paracasei* 101, *L. gasseri* 341/2, *L. paracasei* 340/1), демонстрирующие высокий уровень антагонистической активности. Из культур лактобактерий были выделены бактериоцины, действие которых на штаммы *C. difficile* соотносилось с уровнем антагонистической активности лактобактерий, при этом подавление роста клостридий имело дозозависимый характер.

Заключение. Оценка антагонистической активности лактобацилл открывает перспективы борьбы с внутрибольничной инфекцией, обусловленной резистентными штаммами, в том числе и использование аутоштаммов лактобактерий для подавления роста токсигенных штаммов *C. difficile*.

Ключевые слова: бактериоцины, антагонистическая активность, лактобациллы, *Clostridium (Clostridioides) difficile*, *C. difficile* — ассоциированная диарея

Summary

Aim: to evaluate antagonistic properties of Lactobacilli against clinically relevant Clostridium (Clostridioides) difficile strains.

Materials and methods: we assessed antagonistic properties of 21 *Lactobacilli* strains isolated from the patients'colon biotope against 31 clinically relevant *C. difficile* strains isolated from faeces of the patients with *C. difficile*-associated diarrhea by means of a double-step culturing in the combined cultivation system.

Results: Lactobacilli strains isolated from the patients'colon biotope had selective antagonistic properties against C. difficile. Lactobacilli strains had different spectrum and intensity of antagonistic activity that showed no correlation neither with species, nor with natural population size. We isolated Lactobacilli strains with high antagonistic activity (L. paracasei 101, L. gasseri 341/2, L. paracasei 340/1). We isolated bacteriocins from Lactobacilli cultures. The influence of bacteriocins on C. difficile strains correlated with antagonistic activity of Lactobacilli; bacteriocins suppressed C. difficile growth in dose-dependent manner.

Conclusion: evaluation of *Lactobacilli* antagonistic activity is a prospective approach to struggle against nosocomial infection caused by resistant strains, particularly using *Lactobacilli* autostrains for suppression of toxigenic *C. difficile* strains growth.

Key words: bacteriocins, antagonistic activity, Lactobacilli, Clostridium (Clostridioides) difficile, C. difficile-associated diarrhea

Введение

Антибактериальные препараты используются для лечения бактериальной инфекции или элиминации условно-патогенной микрофлоры. В свою очередь антибиотики вызывают изменение микробиоценоза, нарушают гомеостаз микробиоты кишечника, что ведет к развитию антибиотикоассоциированной диареи. Эскалация применения антибактериальных препаратов усугубляет эти процессы. За последнее десятилетие значительно возросла заболеваемость антибиотикоассоциированной диареей, вызванной клостридиальной инфекцией, участились случаи тяжелого течения болезни с летальным исходом. Одним из этиологических агентов антибиотикоассоциированной диареи является токсигенная С. difficile, а микроэкологическое нарушение

микробиоценоза кишечника позволяет активно пролиферировать этому патогену. Для устранения данной патологии в терапии часто используют пробиотические препараты, которые помогают не только предупреждать рецидив, но и осуществлять профилактику антибиотикоассоциированной диареи [1]. Неотъемлемой составляющей микробиоты кишечника являются молочнокислые бактерии рода Lactobacillus (лактобациллы), которые в значительной степени обусловливают микроэкологическое благополучие этого биотопа и защиту от пролиферации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [2, 3]. Антагонистическая активность бактерий определяет выживание микроорганизмов при их взаимодействии в бактериальных

ассоциациях, которые являются частью ассоциативного симбиоза - многокомпонентной системы, где кроме хозяина и доминантного микросимбионта участвуют ассоциативные симбионты, выполняющие функцию формирования и обеспечении стабильности и продуктивности симбиоза [4, 5]. В силу своей способности к продукции широкого спектра бактериоцинов лактобациллы оказывают выраженное антагонистическое воздействие на многие грампозитивные и грамнегативные бактерии, препятствуя, тем самым, колонизации толстой кишки патогенной бактериальной флорой [6, 7]. Бактериоцины - это комплекс веществ с узконаправленной или широкой активностью, содержащий полипептиды, белки, полисахариды и липиды [8]. Бактериоцины лактобактерий по своему составу неоднородные и отличаются по спектру и механизму действия, по физико-химическим, биологическим и генетическим характеристикам. По степени выраженности антагонистической

активности в отношении различных патогенных и условно-патогенных бактерий лактобациллы демонстрируют как видовые, так и штаммовые различия [9, 10]. Молочнокислые бактерии образуют широкий набор бактериоцинов: лактококцин, лактоцин, педиоцин, ацидоцин В, баварицин МN, курвацин и др.

Поэтому поиск новых штаммов лактобацилл, обладающих антагонистической активностью в отношении *C. difficile*, дает возможность значительно уменьшить число и степень тяжести возможных осложнений при антибиотикоассоциированной диарее, а также является безопасной альтернативой фекальной трансплантации микробиоты, которая применяется в настоящее время для лечения антибиотикоассоциированной диареи, обусловленной резистентной к антибиотикам *C. difficile* [11].

Целью исследования явилось изучение антагонистической активности лактобацилл на клинические штаммы C. difficile.

Материалы и методы исследования

Культуры лактобактерий (21) и токсигенные штаммы *C. difficile* (31) были изолированы из просветных фекалий пациентов ФГБУ «ГНЦК им. А. Н. Рыжих» Минздрава России, у которых наблюдалась клиническая картина С. difficile - ассоциированной диареи. Бактериологическое исследование просветных фекалий было выполнено в соответствии с общепринятыми рекомендациями и учетом физиологических, биологических потребностей изолируемых культур микроорганизмов. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с помощью времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) (Bruker, США). Методика основана на выявлении уникального набора белков бактерии. Экстракцию рибосомальных белков проводили муравьиной кислотой. Идентификация считалась достоверной при score ≥ 2,3. Штамм Lactobacillus plantarum, выделенный из коммерческого препарата пробиотика «Лактобактерин сухой» (ФГУП «НПО "Микроген", Нижний Новгород; серия 46/06-1209), идентифицированный с помощью времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) (Bruker, США) и обозначенный как LP-К, был использован в качестве эталонного антагониста.

Антагонистическая активность лактобацилл относительно токсигенных *C. difficile* оценивалась в рамках авторской методики [12], основанной на методе двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы (КСК). На первом этапе культивирования 100 мкл суспензии лактобацилл оптической плотностью 1,0 McF равномерно рассевали строго по поверхности MRS-агара, соответствующей ½ площади комбинированной системы культивирования, после чего посевы инкубировались при 37 °С в течение 48 час в обогащённой углекислотой (СО2) атмосфере. Через 48 часов инкубации к выросшему потенциальному штамму-антагонисту по поверхности второй, оста-

вавшейся незасеянной половине КСК, равномерно засевали 48-и часовой культурой *C. difficile*, для этого 100 мкл суспензии оптической плотностью 1,0 МсF, после чего посевы инкубировали 48 часов в анаэробных условиях [13].

По истечении срока второй инкубации производили учёт результатов эксперимента: от середины края газона лактобациллы в перпендикулярном ему направлении производили измерения расстояния до фронтальной точки края газона *C. difficile*.

Результат оценивали по зоне задержки роста *C. difficile*: при этом зону задержки роста длиной до 1 мм расценивали как отсутствие антагонистической активности лактобактерий, от 1 мм до 10 мм – как низкую антагонистическую активность лактобактерий, от 11 мм до 29 мм – как умеренную антагонистическую активность лактобактерий, и зону задержки роста от 30 мм до 45 мм – как высокую антагонистическую активность (рисунок. 1 на цветной вклейке в журнал).

Общие методы выделения бактериоцинов из культуральной жидкости сводятся к их осаждению и нескольких этапов очистки с помощью катионо-обменной, гель-проникающей, обращенно-фазовой хроматографии [14]. Для оценки содержания активных бактериоцинов в исследуемых штаммах молочнокислых бактерий проводили их предварительную двустадийную очистку. Для этого клетки лактобактерий суспендировали в дистиллированной воде и разрушали с помощью ультразвука на ультразвуковом дезинтеграторе. С помощью 0,1М HCl подводили рН гомогената до 3,0, инкубировали при перемешивании и температуре 40 °C в течение 2 часов, затем центрифугировали при 12000 об/ мин в течение 10 минут. К супернатанту добавляли твердый сульфат аммония (до 50% насыщения) и осаждали белки в течение 12 ч при температуре 20 °C с перемешиванием. После центрифугирования при 10000 об/мин осадок диализировали против фосфатно-солевого буферного раствора (рН 5,5) и затем готовили пробы для анализа белков

с помощью SDS-электрофореза, затем проводили анализ с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофоретический анализ бактериоцинов проводили по методу Лэммли [15]. Белки в растворе являются заряженными частицами. Заряд возникает при диссоциации группировок в боковых радикалах аминокислот и при связывании ионов. Перемещение молекул белков, находящихся в растворе происходит под действием электрического однородного поля со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Таким образом, к аноду движутся белки с отрицательным зарядом, а к катоду - белки с положительным зарядом. Электрический ток проходит через буферный раствор, который является проводником. В качестве носителя использовали 15% полиакриламидный гель (ПААГ) (8х10см), содержащий 0,1% додецилсульфата натрия. Достоинством ПААГ является то, что он химически инертен, прозрачен и не требует сложностей в приготовлении, а недостатком - ядовитость акриламида. Также ПААГ имеет свойства молекулярного сита, что позволяет проводить разделение белков не только по заряду, но и по размеру частиц. Быстрее всего через поры геля проходят мелкие молекулы. Для разделения частично очищенного препарата бактериоцинов

из клеточной массы штамма использовали обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В этом случае полярность неподвижной фазы меньше полярности подвижной фазы. Анализ проводили с помощью хроматографа Agilent Technologies 1260 Infinity (USA) на колонке С18 для обращенно-фазовой хроматографии, при скорости потока 0,5 мл/мин. Подвижной фазой является жидкость, которая не смешивается с неподвижной фазой хроматографической колонки. Разделение компонентов смеси основано на различии их коэффициентов распределения между неподвижной и подвижной фазами. Подвижная фаза под высоким давлением проходит через колонку со стационарной фазой. В работе использовали линейный градиент подвижной фазы, создаваемый элюентом А (0.1%-ный раствор ТФУ в воде) и элюентом В (0,1%-ный раствор ТФУ в ацетонитриле) при скорости потока 0,5 мл/мин. Реагенты готовили с применением воды высшей степени очистки (18,1 Мом/см), полученной на установке Milli-Q Plus («Millipore», Франция). Детектирование разделяемых веществ осуществляли при 280 нм в градиенте концентрации элюента В (от 0 до 80-100%); время анализа составляло 20 мин. Объем вводимых проб составлял 20 мкл.

Результаты исследования

Содержание лактобацилл в 31 изученном образце просветных фекалий варьировало от 10^3 до 10^7 КОЕ/г; видовой состав выделенных штаммов лактобацилл приведен на рисунке 2. Как видно, среди выделенных штаммов лактобацилл наиболее часто встречались *L. rhamnosus* (5), *L. fermentum* (3), *L. paracasei* (7); прочие виды были представлены единственной культурой.

Спектр токсинов среди выделенных штаммов *C. difficile* у заболевших пациентов распределялся следующим образом: токсины A определялись у 16,1% (5), токсин B у 67,8% (21) и оба токсина присутствовали у 16,1% (5) пациентов.

Антагонистическая активность выделенных культур лактобацилл относительно клинических штаммов *C. difficile* представлена в таблице 1.

При исследовании антагонистической активности лактобактерий по отношению к *C. difficile*, были выделены культуры с высокой, средней и отсутствием антагонистической активности (рисунок 3). Антагонистически неактивные лактобактерии были не способны подавлять рост *C. difficile* в отличие от высокоактивных штаммов. Контрольный штамм LP-К в большей степени (71%) демонстрировал высокий уровень антагонистической активности относительно штаммов *C. difficile*.

Пять штаммов из девятнадцати изученных лактобацилл были более активными антагонистами в отношении *C. difficile*. Антагонистическая активность трех штаммов лактобактерий была сопоставима с таковой контрольного штамма LP-K, а у два штамма *L. rhamnosus* 400 и *L. paracasei* 245 проявляли наибольшую антагонистическую активность относительно клинических изолятов *C. difficile*, по сравнению с контрольным (рисунок 4).

Результаты изучения электрофореграммы проб свидетельствуют о присутствии в клеточных суспензиях белков (предположительно бактериоцинов) с молекулярной массой 6-9 kDa. Штаммы лактобактерий с высоким содержанием белка в области характерных для бактериоцинов молекулярных масс проявляли высокую биологическую активность. Штаммы L. paracasei 340/1, L. gasseri 341/2, L. rhamnosus 400 по результатам тестирования (рисунок 5 на цветной вклейке в журнал) выделенных бактериоцинов являются основными кандидатами на выделение для лечения C. difficile ассоциированной инфекции. Определение чувствительности токсигенных штаммов C. difficile к выделенным из фильтрата культур лактобацилл веществ демонстрировало аналогичную картину, соответствующую степени антагонистической активности исходной культуры.

Непосредственное воздействие лактобактерий на токсигенные C. difficile, обусловленное антагонистической активностью, осуществляется с помощью неспецифических и специфических факторов. Неспецифическими факторами являются: образование органических кислот; образование низкого окислительно-восстановительного потенциала, за счет использования кислорода; конкуренцию за питательный субстрат. К специфическим факторам относят: синтез бактериоцинов, образование антибиотиков и жирных кислот [16]. Благодаря своей способности синтезировать антибактериальные вещества (бактериоцины), лактобациллы оказывают положительный эффект при лечении антибиотикоассоциированной диареи, ассоциированной с C. difficile, снижают тяжесть течения заболевания.

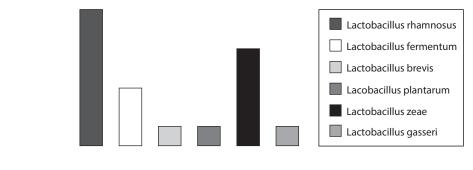
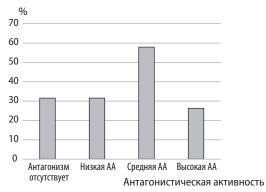


Рисунок 2. Видовой состав лактобацилл Figure 2. Lactobacillus species composition



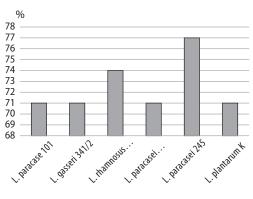


Рисунок 3.
Антагонистическая активность лактобактерий в отношении *C. difficile*Figure 3.
Antagonistic activity of lactoba-

Antagonistic activity of lactoba cilli against *C. difficile*

Рисунок 4. Антагонистические свойства высокоактивных лактобактерий Figure 4.

Antagonistic properties of highly active lactobacilli

									L	actob	acillu	ıs								
Clostridium difficile	L. rhamnosus 239/1	L.paracasei 415	L. plantarum 244/2	L.paracase 101	L. gasseri 341/2	L.fermentum 547	L.paracasei 416/1	L. rhamnosus 400	L.paracasei 215	L.paracasei 340/1	L.brevis 340/2	L. rhamnosus 241/2	L.fermentum 349	L. rhamnosus 214	L.paracasei 243	L. rhamnosus 509	L.fermentum 58	L. zeae 215	L.paracasei 245	LP-K
330	40	15	40	40	40	40	40	20	40	20	5	35	5	40	40	20	40	20	27	40
361	40	30	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	20	15	40	20	35	15
383	40	40	10	40	35	40	40	40	40	15	10	40	10	40	20	20	40	15	40	40
392	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40	20	40	40	40	40	10	25	40	40	40
447	40	15	20	40	35	40	40	40	30	40	5	40	40	30	40	40	20	40	25	40
470	30	40	20	40	40	40	40	40	40	40	5	15	40	40	40	40	35	40	40	20
718	10	40	40	40	15	40	2	40	0	12	15	10	0	15	2	38	40	40	40	0
742	15	40	20	40	39	0	40	40	25	40	40	40	0	40	0	28	40	5	40	15
559	10	40	8	13	7	40	0	40	0	3	0	40	2	12	2	40	0	10	38	40
642	5	12	40	10	5	2	28	3	3	2	0	0	0	15	5	40	0	20	40	2
770	11	7	2	40	12	40	20	10	30	39	40	5	0	40	40	10	5	20	40	25
700	10	40	22	2	40	5	12	2	3	40	40	40	30	5	2	15	5	40	2	40
757	10	10	12	10	20	15	40	40	5	10	10	20	10	40	8	0	40	0	12	40
729	40	0	0	40	40	0	40	40	0	40	27	40	40	40	0	40	40	40	40	40
498	0	0	0	40	40	0	0	40	40	40	40	0	40	40	40	0	40	40	35	0
445	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
506	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
610	0	0	40	0	0	0	38	40	0	40	40	40	40	40	35	0	40	40	0	40
477	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
235	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
294	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
608	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
548	40	30	30	25	40	40	20	27	40	30	12	25	30	20	40	27	35	25	35	27
504	30	20	40	35	40	40	40	40	40	27	20	35	25	27	30	23	40	35	35	30
351	35	35	35	35	35	40	35	30	35	35	20	30	30	25	35	25	40	35	35	35
511	35	30	30	30	35	40	35	30	35	30	20	35	25	25	30	23	20	30	30	40
578	30	30	40	30	40	40	30	40	40	35	35	30	25	30	40	35	40	30	15	40
544	5	7	13	0	0	0	0	5	10	0	10	7	5	0	10	5	20	20	0	0
678	30	15	7	30	10	40	5	20	25	10	3	10	14	7	20	15	12	15	25	40
356	10	25	15	25	35	5	12	0	20	40	5	20	5	10	25	40	20	15	30	35

Таблица 1. Антагонистическая активность выделенных культур лактобацилл относительно *C. difficile*, выделенных у пациентов с антибиотикоассоциированной диареей

К статье

Перспективы использования антагонистической активности лактобацилл для подавления роста *Clostridium (Clostridioides) difficile* (стр. 19–24)

To article

Prospects of using antagonistic activity of lactobacilli to suppress the growth of *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* (p. 19–24)

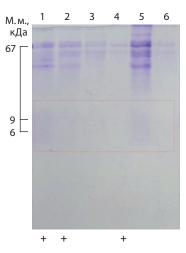
Рисунок 1. Figure 1.

Pисунок 5. Figure 5.



Комбинированная система культивирования бактерий для оценки антагонистической активности лактобацилл относительно $C.\ difficile$

Combined system for cultivation of bacteria Lactobacillus evaluation of antagonistic activity relative to $C.\ difficile$



Электрофореграмма препаратов, полученных после частичной очистки бактериоцинов из штаммов:

- $1-L.\ paracasei\ 340/1,\ 2-L.\ gasseri\ 341/2,\ 3-L.\ paracasei\ 101,\ 4-L.\ paracasei\ 245,\ 5-L.\ rhamnosus\ 400,\ 6-L.\ paracasei\ 415$ Electrophoregram preparations obtained after partial purification of bacteriocins from the strains:
- 1 L. paracasei 340/1, 2 L. gasseri 341/2, 3 L. paracasei 101,
- 4 L. paracasei 245, 5 L. rhamnosus 400, 6 L. paracasei 415

Заключение

На сегодняшний день создание новых антибактериальных препаратов не приводит к продолжительным успехам в борьбе с С. difficile – ассоциированной инфекцией. В связи с этим, представляется актуальным использование лактобактерий, изолированных из толстокишечного биотопа и обладающих антагонистической способностью в отношении С. difficile. Оценка степени выраженности способности лактобактерий подавлять рост других микроорганизмов, особенно с бескислородным типом дыхания, представляет определенные трудности, поэтому

была разработана комбинированная система культивирования микроорганизмов, использование которой обеспечивает культивирование каждого микроорганизма в соответствии с его биологическими свойствами. По степени выраженности антагонистической активности, равно как и по её спектру, лактобациллы демонстрируют как видовые, так и штаммовые различия. Лактобациллы, выделенные из кишечного биотопа человека проявляли избирательную антагонистическую активность в отношении *C. difficile*.

Литература | References

- Осадчук М. А., Свистунов А. А. Антибиотикоассоциированная диарея в клинической практике //Вопросы современной педиатрии. – 2014. – Т. 13. – № 1.
 Osadchuk M. A., Svistunov A. A. Antibiotic-associated diarrhea in clinical practice. Current pediatrics. 2014;13(1):102–108. (In Russ.) https://doi.org/10.15690/ vsp.v13i1.918
- 2. AFRC R.F. Probiotics in man and animals //Journal of Applied Microbiology. 1989. T. 66. № 5. C. 365–378.
- 3. Бондаренко В. М., Воробьев А. А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2004. № 1. С. 84–92.
 - Bondarenko VM1, Vorob'ev AA. Dysbacteriosis and preparations with probiotic function. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2004 Jan-Feb;(1):84–92.
- Костерина, В. В., Рябинина, А. П., Леонов, В. В., и соавт. Изменение среднесуточной гемолитической и каталазной активности госпитальных штаммов ассоциативной микробиоты под действием экзометаболитов Candida albicans в эксперименте // Вестник Югорского государственного университета. – 2009. № 3 (14).
 - Kosterina, V.V., Ryabinina, A.P., Leonov, V.V., et al. Izmeneniye srednesutochnoy gemoliticheskoy i katalaznoy aktivnosti gospital'nykh shtammov assotsiativnoy mikrobioty pod deystviyem ekzometabolitov Candida albicans v eksperimente. [The change in the average daily hemolytic and catalase activity of hospital strains of associative microbiota under the influence of Candida albicans exometabolites in the experiment]. Bulletin of the Ugra State University. 2009, no. 3 (14), pp. 58–61.
- Маркова Ю. А., Романенко А. С., Шафикова Т. Н. Механизмы полигостальности бактерий // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2007. – Т. 3. – № 2.
 Markova Yu. A., Romanenko A. S., Shafikova T. N. Mechanisms of bacterial polyhostality Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2007, Vol. 3, No. 2, pp. 15–23.
- Todorov S. D., van Reenen C. A., Dicks L. M. T. Optimization of bacteriocin production by Lactobacillus plantarum ST13BR, a strain isolated from barley beer //
 The Journal of general and applied microbiology. 2004. –
 T. 50. № 3. C. 149–157.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U. et al. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118 //Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. T. 104. № 18. C. 7617–7621.

- 8. *Кудлай Д. Г., Лиходед В. Г.* Бактериоциногения //М.: Медицина, 1966. С. 202.
 - Kudlai D. G., Likhoded V. G. Bacteriocinogeny. Moscow, Medicine, 1966, 202 p.
- De Vuyst L., Vancanneyt M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria //Food Microbiology. – 2007. – T. 24. – № 2. – C. 120–127.
- 10. Hertel C., Meroth C. B. Species and strain specific identification of lactic acid bacteria in complex microflora // Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift. 2003. T. 116. № 11–12. C. 517–523.
- Сухина, М. А., Михалевская, В. И., Ачкасов, С. И., Сафин, А. Л. Антагонизм лактобактерий против токсигенной Clostridium difficile //Колопроктология. – 2017. – № S3. – С. 82a-83.
 - Sukhina, M.A., Mikhalevskaya, V.I., Achkasov, S.I., Safin, A.L. Antagonism of Lactobacteria against Toxigenic Clostridium difficile. Coloproctology. 2017, no. S3, pp82–83.
- 12. Сухина, М. А., Бургасова, О. А., Жуховицкий, В. Г., & Ющук, Н.Д. Антагонистическая активность лактобацилл толстой кишки //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 1. С. 41–49.
 - Sukhina MA, Burgasova OA, Zhukhovitskii VG, Iushchuk ND. Antagonistic activity of lactobacilli of the colon. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2012 Jan-Feb;(1):41–9.
- 13. *Todorov S. D., van Reenen C. A., Dicks L. M. T.* Optimization of bacteriocin production by Lactobacillus plantarum ST13BR, a strain isolated from barley beer // The Journal of general and applied microbiology. 2004. T. 50. № 3. C. 149–157.
- Carolissen-Mackay V., Arendse G., Hastings J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers //International Journal of Food Microbiology. 1997. T. 34. № 1. C. 1–16.
- 15. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 //nature.–1970.–T. 227.–№ 5259.–C. 680.
- 16. Пульчевская Л. П., Васильев Д. А., Золотухин С. Н. Методические указания к лабораторно-практическим занятиям по дисциплине «Пробиотики»// У.: Ульяновская ГСХА, 2010. С. 70.
 - Pulchevskaya L. P., Vasiliev D. A., Zolotukhin S. N. Metodicheskiye ukazaniya k laboratorno-prakticheskim zanyatiyam po distsipline «Probiotiki» [Guidelines for laboratory and practical classes on the subject "Probiotics"]. Ulyanovsk, Ulyanovskaya State Agricultural Academy Publ, 2010, 70 P.