

Регулирование фекальных бактерий порядка *Clostridiales* и бутирата путем применения пробиотиков, содержащих *Lactobacillus paracasei* DG, различается у здоровых взрослых людей¹⁻³

Chiara Ferrario,⁴ Valentina Taverniti,⁴ Christian Milani,⁵ Walter Fiore,⁶ Monica Laureati,⁴ Ivano De Noni,⁴ Milda Stuknyte,⁴ Bessem Chouaia,⁴ Patrizia Riso⁴ и Simone Guglielmetti^{4*}

⁴Кафедра питания, экологии и нутрициологии (DeFENS), Миланский университет, Милан, Италия;
⁵лаборатория пробиогеномики, кафедра наук о живой природе, Пармский университет, Парма, Италия;
«Софар С.п.А.», Треццано Роса, Италия

Аннотация

Общие сведения: считается, что регулирование микрофлоры в желудочно-кишечном тракте является первичной задачей в определении эффективности пробиотиков у здоровых людей.

Цель: данное исследование проведено с целью определения влияния пробиотиков на микробную экологию в кишечнике здоровых добровольцев.

Методы: для характеристики фекальной микробиоты у здоровых взрослых людей (23-55 лет) обоих полов до и после 4 недель ежедневного приема капсул, содержащих не менее 24 миллиардов жизнеспособных клеток *Lactobacillus paracasei* DG, в рамках рандомизированного, двойного слепого, перекрестного, плацебо-контролируемого исследования применялось секвенирование генов рибосомальной 16S-РНК с высокой пропускной способностью.

Результаты: прием пробиотиков индуцировал увеличение протеобактерий ($P = 0,006$) и *Clostridiales* рода *Coproccoccus* ($P = 0,009$), в то время как количество *Clostridiales* рода *Blautia* ($P = 0,036$) уменьшилось; тенденция к снижению наблюдалась также для *Anaerostipes* ($P = 0,05$) и *Clostridium* ($P = 0,06$). Мы также обнаружили, что эффект от пробиотиков зависит от начальной концентрации бутирата. В действительности, у участников исследования, у которых концентрация была >100 ммоль/кг, после применения пробиотиков она снизилась на $49 \pm 21\%$, а также уменьшилось количество бактерий 6 родов *Clostridiales*, а именно *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Anaerostipes*, *Pseudobutyrvibrio*, *Clostridium* и *Butyrvibrio* ($P = 0,021$). А у участников с начальными концентрациями <25 ммоль/кг пробиотик наоборот способствовал увеличению бутирата на $329 \pm 255\%$ (среднее значение \pm стандартное отклонение (SD)) одновременно с уменьшением примерно на 55% *Ruminococcus* ($P = 0,016$) и увеличением на 150% рода *Bacteroidales* ($P = 0,05$).

¹При поддержке «Софар С.п.А.»

² Информация о конфликте интересов авторов: исследование проводится при поддержке компании «Софар С.п.А.», которая производит и продает пробиотический продукт, используемый в исследовании. W. Fiore является сотрудником «Софар С.п.А.». У С. Ferrario, V. Taverniti, С. Milani, М. Laureati, I. De Noni, М. Stuknyte, В. Chouaia, Р. Riso и S. Guglielmetti отсутствуют конфликты интересов.

³ Дополнительные таблицы 1-3, дополнительные рисунки 1-8 и дополнительные методы доступны по ссылке "вспомогательные материалы" в онлайн-публикации статьи и по той же ссылке в оглавлении по адресу: <http://jn.nutrition.org>.

* Корреспонденцию направлять. электронная почта: simone.guglielmetti@unimi.it.

Выводы: применение *L. paracasei* DG увеличило соотношение бактерий *Blautia: Coprococcus*, что, согласно литературе, потенциально полезно для здоровья человека. Однако пробиотическое воздействие на микрофлору и короткоцепочечные жирные кислоты строго зависит от исходных характеристик микробной экосистемы кишечника. В частности, концентрация бутирата в кале может представлять собой важный биомаркер для определения эффективности пробиотического лечения. Данное исследование было зарегистрировано на сайте www.controlled-trials.com/isrctn как ISRCTN56945491. J. Nutr. 144: 1787-1796, 2014.

Введение

Спрос на пробиотики растет во всем мире, отчасти это связано с тем, что все больше потребителей узнает об их потенциальной пользе для здоровья человека. В то же время, как промышленные производители, так и органы государственного регулирования и контроля уделяют особое внимание проверке эффективности пробиотиков, о чем свидетельствует европейское регулирование (Европейская комиссия) № 1924/2006 о требованиях в отношении продуктов питания. Пробиотики являются типичным примером продуктов, соответствующих требованиям, регулируемым этим законом.

В однозначно принятом определении пробиотиков [«это живые микроорганизмы, которые при приеме в достаточном количестве полезны для здоровья организма-хозяина» (1)] косвенно говорится о том, что для того, чтобы продукт, содержащий жизнеспособные микробы, считался «пробиотиком», должна быть доказана польза для здоровья. Было установлено, что пробиотики приносят пользу здоровью при нескольких патологических или дисфункциональных состояниях (2,3), однако их действие сложно оценить в здоровой популяции из-за отсутствия принятых и утвержденных биомаркеров (4). Следовательно, влияние пробиотиков на состав микрофлоры кишечника является первым предметом исследований по оценке эффективности пробиотика (5).

Кишечная микрофлора участвует в многочисленных важных иммунологических, пищевых и метаболических процессах, что поддерживает идею о том, что она является органом человеческого организма (6). Общеизвестный факт, что изменение бактериального состава кишечной микрофлоры вызывает функциональные изменения, которые могут повлиять на физиологию организма-хозяина (7). Тем не менее, способность пробиотиков влиять на кишечные микроорганизмы, хотя и подтвержденная в нескольких исследованиях, все еще обсуждается (8) в связи с многочисленными факторами, такими как различная восприимчивость потребителей к приему пробиотиков и заметные различия в пробиотиках (например, различия в штамме микроорганизмов, концентрации жизнеспособных клеток, рецепте).

Для устранения сомнений мы использовали перекрестный дизайн при исследовании хорошо изученного пробиотического продукта Энтеролактис Плюс («Софар»). Энтеролактис Плюс является коммерческой пробиотической добавкой, содержащей один штамм *Lactobacillus paracasei* DG, который принадлежит к виду, обычно используемому в качестве пробиотика, и который был в значительной степени исследован в отношении его оздоровительных свойств [например, штамм *Shirota* (9)]. *Enterolactis* содержит > 24 миллиардов КОЕ в капсуле, это высокая доза по сравнению с большинством аналогичных присутствующих на рынке препаратов, которые содержат на порядок меньше жизнеспособных бактериальных клеток. Доказано, что штамм бактерий *Enterolactis L. paracasei* DG обладает лечебными свойствами и способствует поддержанию ремиссии симптоматической неосложненной дивертикулярной болезни (10), уменьшению воспаления в слизистой оболочке толстой кишки у больных легкой формой

неспецифического язвенного колита (11) и уменьшению побочных эффектов от эрадикационной терапии против *Helicobacter pylori* (12). Однако влияние *L. paracasei* DG на здоровых людей до сих пор не исследовано. Согласно этому исследованию, мы оценивали изменения, вызванные потреблением Энтеролактис Плюс в микрофлоре кишечника у здоровых взрослых людей.

Оценка изменений микрофлоры кишечника человека является сложной задачей в связи с выраженной изменчивостью бактериального состава в микробной экосистеме (13). По этим причинам в своем рандомизированном, двойном слепом, перекрестном, плацебо-контролируемом исследовании мы использовали технологию секвенирования ДНК следующего поколения. Кроме того, мы оценили влияние пробиотиков на концентрацию короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) в кале и рассчитали метаболический потенциал бактерий.

Участники и методы исследования

Участники. В исследовании PROBIOTA-DG (влияние пробиотического штамма *Lactobacillus paracasei* DG на кишечную микрофлору) приняли участие 34 здоровых добровольца (19 женщин и 15 мужчин; возраст $34,9 \pm 10,7$ лет; ИМТ $22,5 \pm 2,7$ кг/м²) (рисунок 1). Вся информация, параметры рандомизации и критерии исключения для каждого участника представлены в дополнительной таблице 1. Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике в научных исследованиях Миланского университета (комментарий № 37/12, 19 декабря 2012 года). Письменное информированное согласие было получено от всех участников. Критериями включения были: хорошее общее состояние здоровья, возраст от 18 до 55 лет, и подписанная форма информированного согласия. Критерии исключения: проведение антибактериальной терапии в течение 1 месяца перед первым визитом, потребление пробиотиков или пребиотиков в течение 1 месяца перед первым посещением, вирусный или бактериальный энтерит в течение 2 месяцев перед первым визитом, язва желудка или двенадцатиперстной кишки в течение 5 лет перед первым посещением, наличие желудочно-кишечных расстройств [например, диарея, воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника (СРК)], беременность или кормление грудью, эпизоды злоупотребления алкоголем или наркотиками. Участникам исследования было рекомендовано соблюдение их обычного режима питания, им было запрещено употребление пробиотического ферментированного молока (традиционный йогурт был разрешен), пробиотических и пребиотических пищевых добавок, продуктов, обогащенных пребиотическими молекулами.

Дизайн исследования. Данное исследование являлось рандомизированным, двойным слепым, плацебо-контролируемым, перекрестным исследованием с 2 параллельными группами (рисунок 1). После 4-недельного этапа участники были случайным образом распределены в группу А (n = 14) или группу В (n = 16). Участники группы А ежедневно принимали капсулы с пробиотиком в течение 4 недель в дополнение к привычному рациону. После 4-недельного периода «отмывки» от препарата им выдавали капсулы с плацебо в течение 4 недель. С участниками группы В поступали противоположным образом: плацебо – промывание – пробиотик. Участники получили рекомендации хранить капсулы (пробиотик или плацебо) при комнатной температуре и избегать воздействия источников тепла. Кроме того, участники получили устные и письменные инструкции употреблять капсулу утром не менее чем за 15 мин до завтрака запивая сырой водой; в качестве альтернативы им разрешалось употреблять капсулу вечером не менее чем через 3 ч после последнего приема пищи. Пробиотический препарат (Энтеролактис Плюс) состоял из желатиновой капсулы, содержащей не менее 24 миллиардов жизнеспособных клеток бактериального штамма *L. paracasei* DG [хранятся в коллекции штаммов микроорганизмов

Института Пастера (CNCM) под кодом I-1572]; капсулы также содержали кремния диоксид и магния стеарат в качестве антиагломератов, а оболочки капсул были окрашены титана диоксидом. Пробиотические капсулы и плацебо были идентичны по цвету и форме. Капсулы доставлялись участникам в металлических коробках, запечатанных пластиковым колпачком, содержащим соли-осушители.

Каждого добровольца просили сделать 5 визитов: перед подготовительным периодом (визит V0), перед первым этапом лечения (V1), после первого лечения (V2), перед вторым этапом лечения (V3) и после второго лечения (V4) (рисунок 1). В ходе каждого визита участникам предлагалось заполнить краткий опросник FFQ, в котором также конкретно указывались потенциальные источники пребиотической клетчатки, с целью исключения различий в диетических привычках в течение всего исследования. В течение каждого 4-недельного периода участники составляли еженедельный дневник (включая Бристольскую шкалу стула), описывающий функции кишечника. Это исследование было зарегистрировано на сайте www.controlled-trials.com/ isrcn за номером ISRCTN56945491.

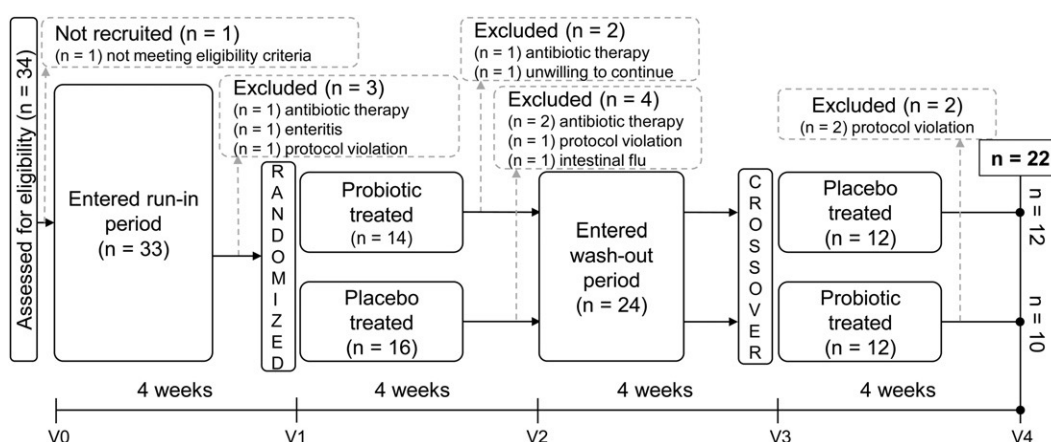


Рисунок 1. Дизайн и график проведения исследования. V0-V4, визиты перед подготовительным этапом, перед первым этапом лечения, после первого лечения, перед вторым этапом лечения, и после второго лечения, соответственно.

Надписи на рисунке:

- Assessed for eligibility (n=34) – выбранные для участия в исследовании
- Not recruited – не участвующие в исследовании
- Not meeting eligibility criteria – не удовлетворяющие критериям включения
- Entered run-in period – вступившие в подготовительный период
- Excluded (исключенные из исследования в связи с):
 - antibiotic therapy – антибактериальной терапией
 - enteritis – энтеритом
 - protocol violation – нарушением протокола
 - unwilling to continue – нежеланием участника продолжать исследование
 - intestinal flu - кишечным гриппом
- Randomized – рандомизированные
- Probiotic treated – лечение пробиотиком
- Placebo treated – применение плацебо
- Entered wash-out period – вступившие в период «отмывки» от препарата
- Crossover – перекрестный переход
- 4 weeks – 4 недели

Сбор образцов кала и выделение метагеномной ДНК. Во время визитов V1, V2, V3 и V4 участники предоставили образцы кала, которые были собраны в стерильные пластиковые контейнеры не позднее чем за 24 часа до визита. Участникам было сказано хранить образцы при комнатной температуре до доставки в лабораторию в соответствии с рекомендациями по хранению микробиоты кишечника для метагеномного анализа (14). Сразу после доставки они хранились при 280°C до извлечения ДНК, которое выполнялось в течение 7 дней с помощью мини-набора Qiaamp DNA Stool (Qiagen) в соответствии со спецификацией производителя.

Анализ микрофлоры. Бактериальный состав микрофлоры в кале определяли путем оценки распределения последовательностей генов 16S-рибосомной РНК (рРНК)⁷ в метагеномной ДНК по технологии ионного секвенирования PGM. Частичная амплификация гена 16S-рРНК (с помощью праймерной пары Probio_Uni и Probio_Rev, которая ориентирована на V3) и реакции секвенирования выполнялись GenProbio в соответствии с оптимизированным протоколом, описанным Milani и соавторами (15). Для анализа всех последовательностей использовалась Qiime (количественное представление о микробиальной экологии) версии 1.7.0 (16) с базой данных GreenGenes, обновленной до версии 13.5 (17). Микроорганизмы были представлены изобилием таксономических уровней: подцарствами, семействами и родами. Последовательности были внесены в Европейский архив нуклеотидов европейского института биоинформатики под кодом PRJEB5801. Бактериальный метаболический потенциал образцов кала вычислительно оценивался с помощью PICRUSt (филогенетическое исследование сообществ путем реконструкции незамеченных состояний, версия 1.0.0 18). Более подробная информация приводится в разделе «Дополнительные методы».

Количественное определение SCFA и лактобактерий в образцах кала. SCFA были количественно определены при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) после извлечения из образцов кала с 6 объемами 0,01 N H₂SO₄. Подробный протокол приводится в разделе «Дополнительные методы». Количественное определение *L. paracasei* DG в образцах кала проводили методом qPCR с праймерами, направленными на ген гликозилтрансферазы welf. Универсальные праймеры, направленные на гены 16S-рРНК, использовались для количественной оценки эубактерий с помощью qPCR. Термические циклы qPCR, последовательности праймеров и подготовка калибровочной кривой подробно описаны в дополнительных методах.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA (версия 10; Statsoft). Для изучения различий между методами лечения использовались как параметрические, так и непараметрические методы. Моделирование частных наименьших квадратов (PLS) выполнялось с помощью Unscrambler X (CAMO). Статистическая значимость установлена на уровне $P \leq 0,05$, а в качестве трендов приняты средние различия с $0,05 < P \leq 0,10$. Подробная информация о принятых статистических подходах приводится в дополнительных методах.

Результаты

Соблюдение режима лечения (комплаентность) и анализ опросников.

Препарат хорошо переносился всеми участниками, не было выявлено никаких побочных эффектов. В ходе исследования участники сохранили свои обычные диетические привычки, с незначительными изменениями, в основном из-за сезонных изменений в наличии овощей и фруктов (исследование началось в феврале и закончилось в июне). В частности, продукты питания с потенциальной пребиотической активностью были сохранены в диете на протяжении всего экспериментального периода. Участники соблюдали (98% соответствия) протокол исследования, что было оценено с помощью подсчета капсул и сбора образцов кала.

⁷ Используемые сокращения: HB, высокая концентрация бутирата; IBS, синдром раздраженного кишечника; LB, низкая концентрация бутирата; PLS, частные наименьшие квадраты; rRNA, рибосомальная РНК.

Примерно треть участников не завершили исследование ($n = 12$). Процент пациентов, исключенных из исследования, оправдан в связи со сложностями, присущими дизайну исследования (т. е. 4-месячному перекрестному исследованию с сезонными изменениями и строгими критериями исключения). Во всем мире 30 (88%) из 34 подходящих участников были распределены случайным образом, 24 (71%) добрались до второго лечения после перекрестного перехода и 22 (65%) завершили исследование ($n = 12$ в группе А и $n = 10$ в группе В; 11 женщин и 11 мужчин, равномерно распределенных между группами).

Данные, представленные в дневниках, описывающих функции кишечника, участниками, завершившими исследование, были проанализированы с помощью непараметрического теста по методу Уальда-Вольфовица. Результаты показали, что после приема пробиотика ($P = 0,006$) (но не после плацебо) значительно усилилось опорожнение кишечника (рисунок 1). Существенных изменений в консистенции стула не было обнаружено.

Регулирование состава фекальной микробиоты при помощи пробиотиков. В общем, было сформировано 11 893 617 высококачественных последовательных «прочтений» геномов (в среднем 135 154 прочтений), протяженностью в 193 ± 4 нуклеотидных пар (bp) (среднее значение \pm SD). Согласно кривым разрежения, большая часть разнообразия микробиоты была охвачена (дополнительный рисунок 2). Мы определили в общей сложности 262 бактериальных рода (61-124 рода на образец кала). Только 27 родов были обнаружены у всех участников в 4 временных точках, что составляет 30-99% от общего числа «прочтений» на выборку (среднее значение: $80 \pm 13\%$). И наоборот, 55 родов присутствовали, по крайней мере, в 1 выборке у всех участников (21% всех родов). С точки зрения альфа-разнообразия, изобилие микробов (коэффициенты Чао и Шеннона) и количество родов не были существенно изменены под воздействием лечения (дополнительный рисунок 2).

Для измерения бета-разнообразия между выборками была исследована последовательность «прочтения» с помощью анализа главных координат на основе дистанционной метрики UniFrac (19). Этот анализ показал, что применение пробиотиков значительно модифицировало общий состав фекальной микробиоты участников, определяемый с помощью повторных измерений ANOVA между применением пробиотиков и плацебо (рисунок 2).

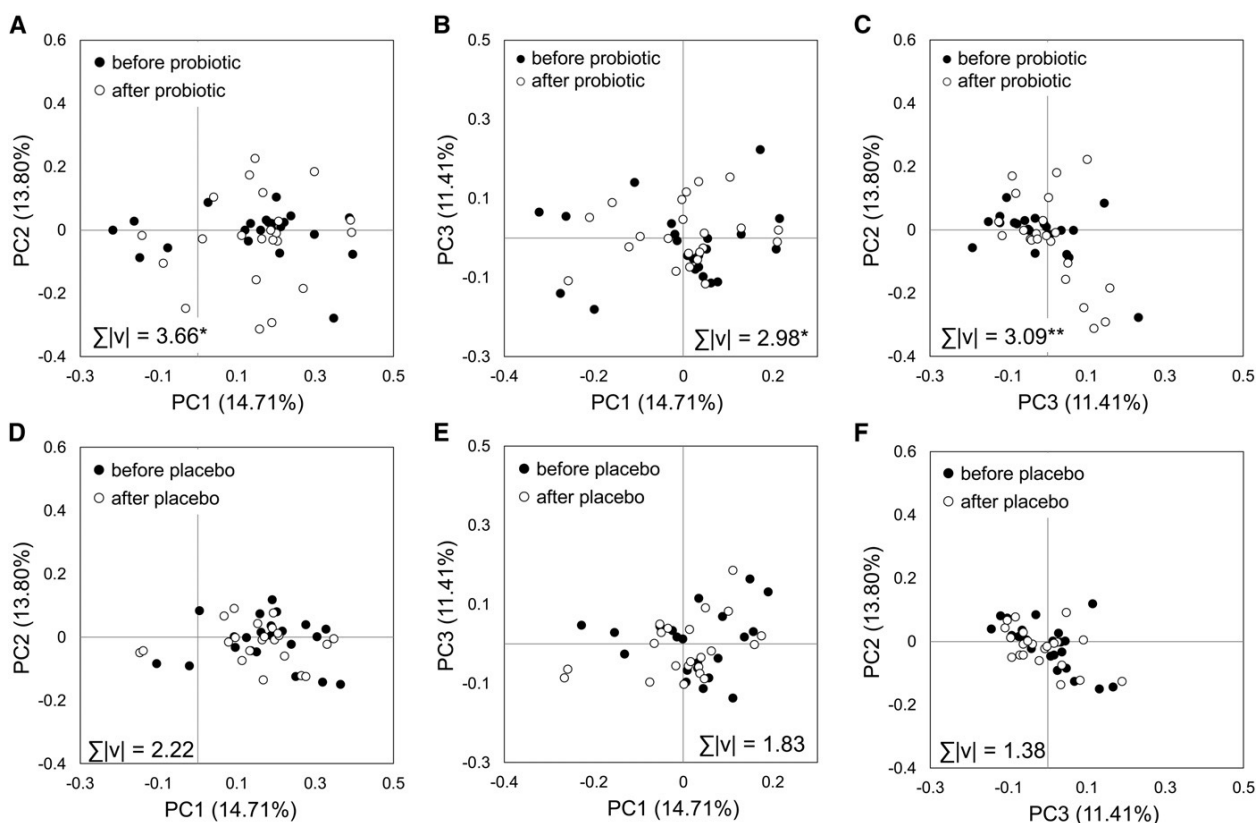


Рисунок 2. Анализ главных координат (PC), выражающий бета-разнообразие образцов. Группы содержат 3 наиболее информативных компонента с двумерным представлением, обеспечивающих различия между образцами. В каждом конкретном образце представлен общий микробиологический состав. Образцы разделены на 4 категории: взятые перед лечением и после лечения пробиотиком (A, B, и C), перед применением и после применения плацебо (D, E, и F). Проценты, указанные вдоль осей, представляют собой долю различий, показанных на осях (отмечено в скобках). $\Sigma|v|$ - сумма абсолютных евклидовых расстояний между парными точками, рассчитанная как сумма квадратов отклонений координат каждой точки до и после лечения ($|v| = \sqrt{[(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2]}$), где 'i' - до лечения, 'j' - после. Парные точки - это 2 образца до и после определенного лечения для конкретного участника. Для каждой пары координат (то есть PC1 и PC2, PC1 и PC3, PC3 и PC2), абсолютные расстояния были значительно больше при применении пробиотика, чем при плацебо. **P, 0.01, *P, 0.05 (двусторонний парный критерий Стьюдента). PC - главные координаты.

Надписи на рисунке:

Before/after probiotic - до/после применения пробиотика

Before/after placebo - до/после применения плацебо

Для выявления микробных групп, подвергшихся модификации при применении пробиотиков, были проанализированы данные об относительной численности бактерий на таксономических уровнях (подцарствах, семействах и родах). Параметрическая статистика (повторные измерения ANOVA) указала на значительные различия при лечении для 1 подцарства и 2 родов. В частности, прием пробиотиков вызывал увеличение числа граммотрицательных бактерий подцарства *Proteobacteria* ($P = 0,006$) и грамположительных бактерий *Clostridiales* рода *Coprococcus* ($P = 0,009$) (рисунок 3). Напротив, количество бактерий рода *Clostridiales Blautia* ($P = 0,036$) было снижено после лечения пробиотиками (рисунок 3). Кроме того, наблюдалась тенденция к снижению бактерий других родов *Clostridiales*, а именно *Clostridium* ($P = 0,06$) и *Anaerostipes* ($P = 0,05$). Важным подтверждением статистической значимости, наблюдаемой для *Proteobacteria*, явилось заметное снижение количества бактерий после применения плацебо (рисунок 3); поэтому этот результат следует пересмотреть из-за возможной неспецифической флуктуации *Proteobacteria* у участников на протяжении всего исследования.

Интересно, что роды *Coprococcus*, *Blautia* и *Anaerostipes* относятся к семейству *Lachnospiraceae* и вместе с родом *Clostridium* являются составляющими порядка *Clostridiales*. Таким образом, применение пробиотиков заметно перераспределяло

микробные таксоны внутри грамположительных Firmicutes порядка Clostridiales, и особенно в семействе Lachnospiraceae.

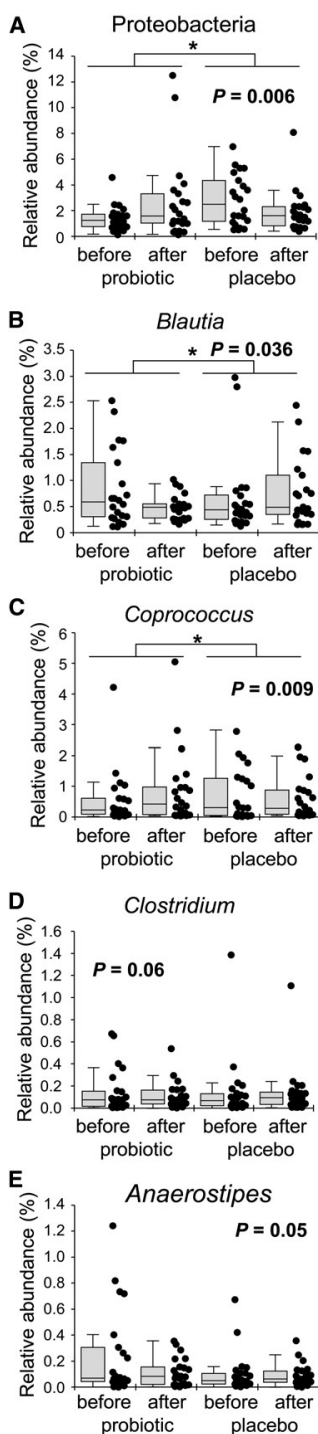


Рисунок 3. Относительное содержание бактериальных таксонов, затронутых применением пробиотиков. Подцарство *Proteobacteria* (A) и роды *Blautia* (B), *Coprococcus* (C), *Clostridium* (D) и *Anaerostipes* (E). Средняя линия на фигурах, располагающихся на графиках показывает медиану, нижняя и верхняя части этой фигуры – 25-й и 75-й процентили, а концы этой линии представляют собой диапазон выбросов, n = 22. Значения P были получены с помощью повторных измерений ANOVA для определения зависимости эффекта лечения от времени. *P, 0,05.

Надписи на рисунке:

Relative abundance – относительное содержание

Before/after probiotic – до/после применения пробиотика

Before/after placebo – до/после применения плацебо

Влияние пробиотика на группы участников с аналогичной микрофлорой. Распределение бактериальных родов в образцах кала значительно различалось между участниками. В частности, мы обнаружили, что перед любым приемом пробиотика

большинство участников могут быть сгруппированы по составу фекальной микробиоты в 2 группы: в первой группе из 11 участников доминировал род *Bacteroides*, а во втором, из 5 участников, *Prevotella* (рисунок 4). Остальные 6 участников характеризовались различными микробиотами без явно доминирующего рода (рисунок 4).

Поскольку межиндивидуальная вариабельность может маскировать потенциальные модификации фекальной микробиоты участников под воздействием пробиотиков, была выбрана подгруппа из 11 участников с преобладающим родом *Bacteroides* и проведен статистический анализ для выявления значительно измененных бактериальных таксонов. Параметрический статистический анализ выявил более широкое пробиотически-зависимое перераспределение микробиоты в подгруппе с преобладающим родом *Bacteroides*, чем при рассмотрении всех участников. На уровне подцарства, помимо подтвержденного изменения *Proteobacteria* ($P = 0,044$), мы также обнаружили значительное уменьшение *Bacteroidetes* ($P = 0,005$) с сопутствующим значительным увеличением *Firmicutes* ($P = 0,024$) (дополнительный рисунок 3). Модификация *Bacteroidetes* может быть в основном связана с уменьшением рода *Bacteroides* ($P = 0,014$), тогда как изменение *Firmicutes* частично связано с увеличением *Coprococcus* ($P = 0,040$) и неклассифицированного рода *Firmicutes* ($P = 0,016$). Кроме того, после применения пробиотиков значительно увеличилась таксономическая единица неклассифицированных бактерий ($P = 0,046$) (рисунок 3). Поэтому анализ участников подгруппы с преобладающим родом *Bacteroides* показал, что прием пробиотиков может, помимо *Firmicutes*, также существенно изменить распределение бактерий, принадлежащих к подцарству грамотрицательных *Bacteroidetes*. В отличие от подгруппы с *Bacteroides*, о подгруппе с преобладающим родом *Prevotella* мы не могли сделать окончательный вывод из-за ограниченного числа участников ($N = 5$).

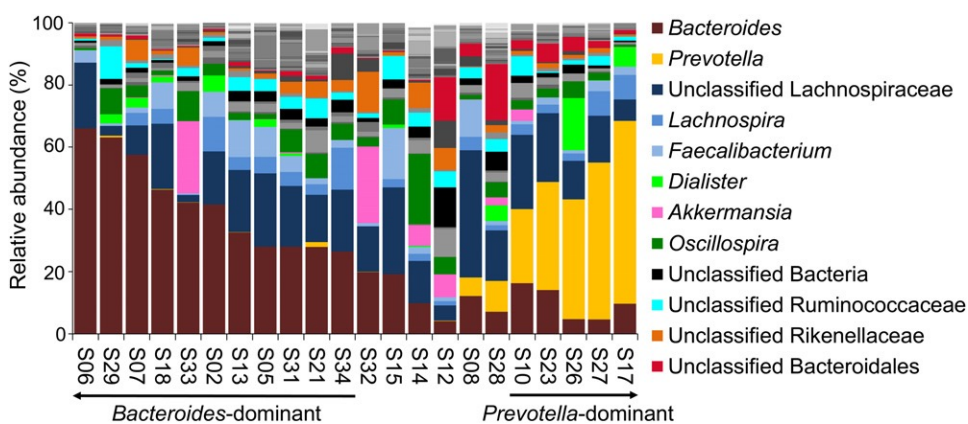


Рисунок 4. Состав микробиоты у участников до приема пробиотика представлен на рисунке в качестве относительного содержания бактериальных родов. Только бактериальные роды с относительным содержанием >10% хотя бы у 1 участника указаны справа от гистограммы. Роды с меньшим относительным содержанием проиллюстрированы в виде шкалы серого цвета. S – участник.

Надписи на рисунке:
dominant – преобладающий род

Влияние пробиотика на фекальные SCFA. Поскольку потребление пробиотиков повлияло на концентрацию бактериальных групп, способных производить SCFA в кишечнике, было количественно определено 3 наиболее часто встречающиеся органические кислоты в кале (т. е. ацетат, бутират и пропионат). При измерении органических кислот в миллимолях на массу образца кала концентрация масляной кислоты значительно снижалась ($P = 0,045$, повторные измерения-ANOVA) после приема пробиотика (дополнительный рисунок 4А). Чтобы противостоять влиянию изменяющегося содержания воды в образцах кала, органические кислоты также измерялись в миллимолях на количество бактериальных клеток в образце, количественно определяемое как qPCR.

Анализ подтвердил, что пробиотическое вмешательство значительно снизило концентрацию бутирата ($P = 0,039$), а также ацетата ($P = 0,047$) и в сумме 3 изученных органических кислот ($P = 0,047$). Концентрация пропионата, напротив, оставалась неизменной во время применения пробиотиков (дополнительный рисунок 4B).

В образцах кала участников концентрация органических кислот, в частности бутирата, колебалась от 4,7 до 231,4 ммоль/кг (рисунок 5). Эффект от применения пробиотиков зависел от начальной концентрации бутирата в образце, а пробиотическое вмешательство заметно снижало ее, особенно в квинтиле взрослых с высокой концентрацией этой органической кислоты [участники с высоким содержанием бутирата HB)]. Напротив, в нижнем квинтиле концентрация бутирата увеличилась [участники с низким содержанием бутирата (LB)] (рисунок 5, дополнительный рисунок 4C, D). Соответственно, критерий Левена показал значительное изменение концентраций бутирата после приема пробиотика ($P = 6,53 \cdot 10^{-25}$), но не после плацебо ($P = 0,79$), что было связано с уменьшением дисперсии после приема пробиотика. При приеме пробиотиков концентрации ацетата, пропионата и суммы 3 SCFA также значительно уменьшились (дополнительной рисунок 4A). Поэтому прием *L. paracasei* DG значительно уменьшил разницу в концентрациях SCFA между участниками.

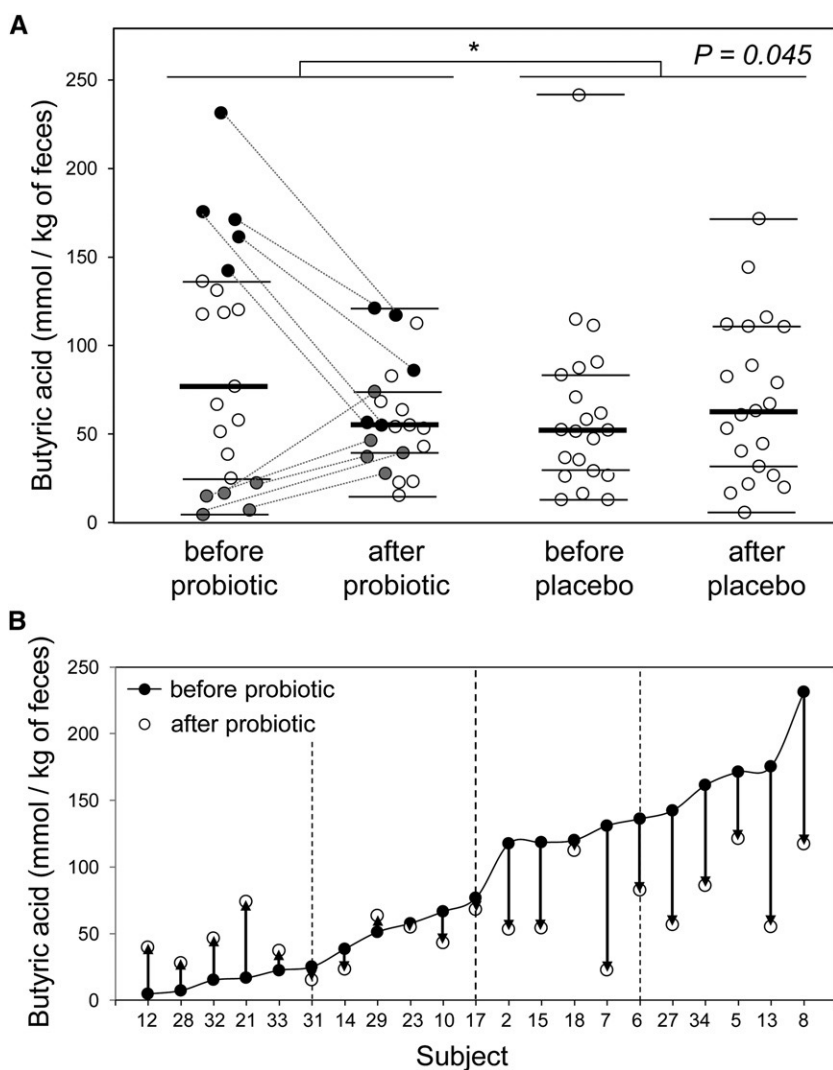


Рисунок 5. Концентрация бутирата в образцах кала участников на протяжении всего исследования. Данные распределяются по квинтилям (горизонтальные полосы на рисунке А и вертикальные пунктирные линии на рисунке В). На рисунке изменение концентрации, вызванное применением пробиотиков, отмечено длинными вертикальными стрелками. Значения Р были получены с помощью повторных измерений ANOVA, сформированных по концентрациям бутирата, для определения зависимости эффекта лечения от времени.

Надписи на рисунке:

Butyric acid (mmol/kg of feces) – масляная кислота (ммоль/кг кала)
 Before/after probiotic – до/после применения пробиотика
 Before/after placebo – до/после применения плацебо
 Subject – участник

Впоследствии мы проанализировали состав микробиоты у НВ участников и сравнили его с составом у ЛВ участников. Анализ показал, что НВ участников можно четко отличить от ЛВ по 7 родам, все из которых принадлежат к *Clostridiales* (дополнительный рисунок 5). В частности, бутират – продуцирующие роды *Faecalibacterium* и *Lachnospira* были, как правило, встречаются у НВ участников и отсутствуют у ЛВ. Согласно PLS, лучшими бактериальными предикторами наличия бутирата являются *Clostridiales* и особенно роды *Faecalibacterium*, *Pseudobutyrvibrio*, *Anaerostipes*, *Veillonella* и *Lachnospira* (рисунок 6).

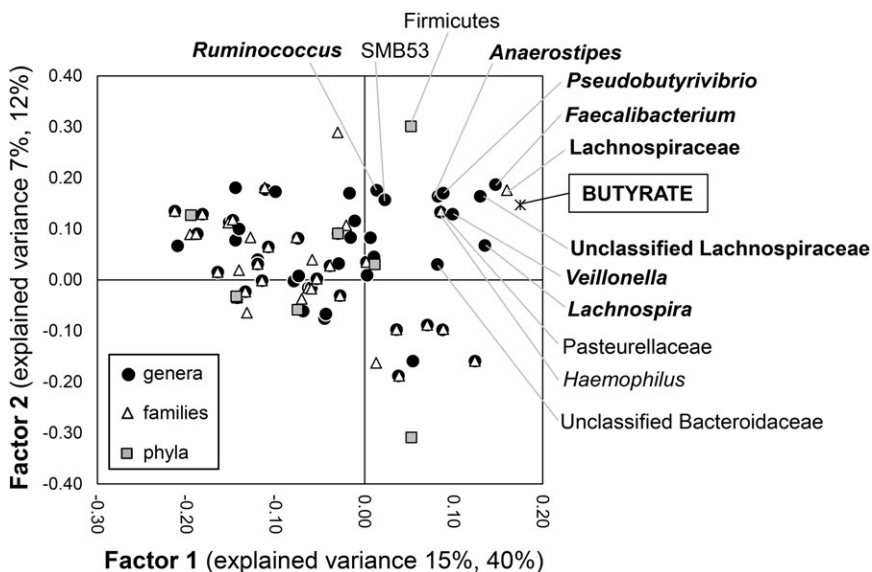


Рисунок 6. Корреляция между фекальным бутиратом и различными микробными группами в образцах кала. X- и Y-участки (коэффициенты 1 и 2) были получены путем частичного анализа наименьших квадратов с использованием в качестве зависимой переменной концентрацию бутирата, выраженную в миллимолях на килограмм кала. Таксоны, принадлежащие к порядку Clostridiales, выделены жирным шрифтом.

Надписи на рисунке:
 Factor 1,2 – фактор 1,2
 Explained variance – объяснимая дисперсия
 Butyrate - бутират

Затем эффект от приема пробиотиков оценивался с точки зрения концентрации бутирата у участников в 2 верхних квартилях (10 участников с концентрацией бутирата выше 100 ммоль/кг и далее обозначенных как НВ_{S10}): среднее снижение бутирата у НВ_{S10} составило 49±21%. Согласно двустороннему парному t-критерию концентрация НВ_{S10}, родов *Clostridiales Faecalibacterium* (P = 0,045) и *Blautia* (P = 0,049) были значительно снижены, с тенденцией к снижению *Anaerostipes* (P = 0,07) после пробиотического лечения. В особенности, значительное снижение наблюдалось в сумме 6 родов *Clostridiales*, потенциальных бутират-продуцирующих бактерий (P = 0,021), а именно *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Anaerostipes*, *Pseudobutyrvibrio*, *Clostridium* и *Butyrvibrio* (дополнительный рисунок 6А).

Также были отдельно проанализированы участники нижнего квартиля в отношении концентрации бутирата (концентрация <25 ммоль/кг; n = 5; ЛВ_{S5}). Результаты свидетельствуют о значительном снижении содержания *Ruminococcus* (P = 0,016). Также обнаружена тенденция к увеличению в изобилии представленного неклассифицированного рода *Bacteroidales* (P = 0,05) (дополнительный рисунок 6В), возможно, с учетом возрастания концентрации фекального бутирата в ЛВ_{S5} (среднее значение ± SD: 329±255%).

В заключение, результаты показали, что влияние пробиотического вмешательства на микробиоту кишечника также зависит от начальной концентрации фекального бутирата.

Анализ капсул Энтеролактис Плюс и персистенции *L. paracasei* DG в кишечнике. Непосредственно перед применением мы изучили жизнеспособные бактериальные клетки в капсулах Энтеролактис Плюс. Количество чашек с агаровой средой составляет $10,72 \pm 0,02 \log(10)$ (т. е. примерно 52 млрд.) КОЕ/капсула, что согласуется с указанием на этикетке продукта (не менее 24 млрд. живых клеток/ капсула).

Согласно экспериментам qPCR, количество клеток *L. paracasei* DG в образцах кала было значительно увеличено после применения пробиотиков (дополнительная таблица 2). Напротив, после периода «отмывки» количество клеток DG уменьшилось до количества, которое было до приема пробиотиков, подтвердив, что интервала в 4 недели достаточно, чтобы избежать эффекта переноса.

Прогнозируемый метаболический потенциал фекальной микробиоты. Программное обеспечение PICRUSt (18) использовалось для определения предварительных показаний изменений функциональных возможностей микробных сообществ. Параметрический статистический анализ прогнозируемых функциональных профилей выявил существенное изменение 8 классов L3 из энциклопедии генов и геномов института химических исследований в Киото. Выявленные виды деятельности относятся к бактериальным путям мембранного транспорта, метаболизма аминокислот, энергетического обмена и, в частности, метаболизма кофакторов и витаминов (дополнительная таблица 3). В частности, установлено, что применение пробиотиков существенно модифицировало ферменты, участвующие в метаболизме никотината и никотинамида ($P = 0,037$) и биосинтезе фолата ($P = 0,033$) (рисунок 7). По данным PLS, лучшие бактериальные предикторы уровней прогнозируемых генов биосинтеза фолатов относятся к подцарству *Bacteroidetes* (*Prevotellaceae* и *Rikenellaceae*), к роду *Corynebacterium* и, в частности, к роду *Firmicutes* семейства *Acidaminococcaceae* под названием *Phascolarctobacterium* (рисунок 8).

Обсуждение

Пробиотические микроорганизмы связаны со многими преимуществами для здоровья и действуют на 3 уровнях: модуляция кишечной микробиоты (уровень 1), взаимовлияние со слизистой оболочкой кишечника (уровень 2) и действие за пределами желудочно-кишечного тракта (например, на системную иммунную систему, печень или мозг) [Уровень 3 (6)]. В этом исследовании мы сосредоточились на первом уровне действия пробиотиков и изучили влияние коммерческого пробиотического продукта на микробную экосистему кишечника у здоровых взрослых людей.

Хотя многочисленные исследования оценивали влияние пробиотиков на состав микробиоты кишечника у здоровых взрослых людей [для обзора (6)], они были ограничены в своих методологиях (например, гибридизация флуоресценции *in situ*, qPCR или денатурирующий градиентный гель - электрофорез), которые часто не подходили для всестороннего анализа высокой композиционной сложности кишечной микробиоты (20). Такие ограничения могут быть преодолены путем анализа профиля микробиоты кишечника с использованием стратегий секвенирования ДНК с высокой пропускной способностью. По общему признанию, протоколы, основанные на секвенировании с высокой пропускной способностью, такие же как используемые в этом исследовании, имеют свои внутренние подводные камни (например, на этапах экстракции ДНК и амплификации ПЦР) (20), но они позволяют гораздо более точную и всестороннюю оценку состава микробиоты, чем

предыдущие методы, основанные на традиционных стратегиях культивирования или молекулярных стратегиях (6). Только одно опубликованное исследование использовало секвенирование высокой пропускной способности для анализа влияния пробиотиков на здоровую взрослую популяцию (13). В частности, Kim и соавторы (8) установили, что у здоровых взрослых людей состав микробиоты кишечника в основном очень устойчив к пробиотикам, и они предположили, что могут быть более чувствительные и менее чувствительные люди к действию пробиотиков. Однако использование различных пробиотических продуктов (как сообщается, пробиотики могут сильно отличаться друг от друга) и ограниченное число участников в группе (только 3), возможно, препятствовали вызванным пробиотиками модификациям в кишечной микробиоте. Фактически, состав микробиоты кишечника у здоровых людей сильно различается, что затрудняет установление однозначных отношений между диетическим или фармакологическим вмешательством и конкретными микробными группами.

Для решения вышеуказанных проблем мы впервые, насколько нам известно, объединили филогенетическую характеристику микробиоты кишечника путем высокопроизводительного секвенирования с перекрестным дизайном для изучения пробиотиков у здорового населения. Этот подход подтвердил, что пробиотический штамм *L. paracasei* DG оказывает влияние на фекальную микробиоту, модифицируя, в частности, специфические микробные группы на уровне подцарства и рода. Особенно подверглись этому 4 рода, принадлежащие к таксону *Clostridiales*, являющегося бактериальным порядком подцарства *Firmicutes*, у которого имеются важные функции в кишечной ферментации пищевых волокон (21). Кроме того, бактерии *Clostridiales* и, в частности, семейство *Clostridiales Lachnospiraceae*, были определены как наиболее активные микробные компоненты в кишечной среде у здоровых взрослых людей (22,23). Лечение пробиотиками перераспределило относительное содержание родов *Lachnospiraceae*, т. е. мы наблюдали значительное увеличение рода *Coprococcus* наряду со значительным уменьшением рода *Blautia*. Сообщалось, что низкое содержание *Coprococcus* было обнаружено у детей-аутистов (24) и у ВИЧ-инфицированных (25). Кроме того, было доказано, что содержание *Coprococcus* у мышей, подверженных стрессу, является низким и коррелирует со стрессор-индуцированным увеличением циркулирующих провоспалительных цитокинов (26). Кроме того, *Coprococcus* в большом количестве был представлен у детей, живущих с домашними животными, и рассматривался как потенциальная бактерия, поддерживающая гипотезу о предотвращении аллергических заболеваний (27). С другой стороны, род *Blautia* был недавно реорганизован для обозначения нескольких неправильно классифицированных видов, принадлежащих к группе *Clostridium XIVa*, включая *Clostridium coccoides* и несколько видов *Ruminococcus*, связанных с *Ruminococcus gnavus* (например, *Ruminococcus torques*) (28). Многочисленные публикации показали высокую распространенность этих бактерий у пациентов с СРК (29-33). Учитывая, что перераспределение в некоторых бактериальных популяциях может быть полезным для здоровых людей, особенно если эти бактериальные популяции подвержены заболеваниям, приведенные выше ссылки предполагают, что модуляция соотношения *Blautia* : *Coprococcus* применением Энтеролактис Плюс лежит в основе потенциальной защитной (здоровой) микробиоты.

Хотя некоторые исследования показали, что бактериальные таксоны в кишечнике, по-видимому, распределены непрерывно (34, 35), недавние исследования выявили 3 полноценные категории, называемые энтеротипами, на основании содержания ключевых бактериальных родов (36). В этом исследовании мы обнаружили 2 группы взрослых людей, в которых доминируют роды *Bacteroides* и *Prevotella*, которые потенциально могут соответствовать энтеротипам 1 и 2, соответственно (36). Тем не менее, несколько участников были охарактеризованы как имеющие смешанный тип структуры и не

относятся к 3 известным энтеротипам. Аналогичный результат был получен при анализе микробиоты кишечника в российских популяциях (37), что привело к предположению, что у человека может существовать гораздо больше энтеротипов. В частности, было предложено, что энтеротипы могут по-разному реагировать на диету и потребление наркотиков (36). Поэтому состав кишечной микробиоты следует учитывать при оценке воздействия препарата или диеты. Соответственно, в этом исследовании мы обнаружили большее количество таксонов, которые были значительно модифицированы применением пробиотика, когда мы отдельно проанализировали группу участников с преобладающим родом *Bacteroides*. Таким образом, наше исследование подтверждает, что разделение по группам популяции по энтеротипам может эффективно уменьшить количество предубеждений по поводу межвидовой (межиндивидуальной) изменчивости.

Порядок *Clostridiales* включает сахаролитические бактерии, которые вносят большой вклад в производство SCFA в кишечнике (21). По этой причине мы количественно определили SCFA во всех образцах кала, собранных во время исследования. Применение пробиотиков значительно уменьшило фекальные концентрации органических кислот, особенно у взрослых с высокой начальной концентрацией этой молекулы. Анализ микробиоты участников с высокой концентрацией бутирата еще раз показал, что наличие *Clostridiales* является ключевой составляющей в наблюдаемых изменениях концентраций бутирата.

Концентрация бутирата и других SCFA широко варьирует в стуле взрослых людей, как уже сообщалось (38). Оптимальная концентрация фекального SCFA для здорового организма неизвестна, и лишь в нескольких исследованиях с противоречивыми результатами оценивалось влияние применения пробиотиков на концентрацию SCFA у здоровых взрослых (39,40). В целом, SCFA и особенно бутират связаны с рядом полезных действий на слизистую оболочку кишечника, и резкое снижение их концентрации характерно для нескольких патологий (41). Однако, роль SCFA у здорового населения была бы более лучше оценена при непатологических физиологических состояниях, таких как IBS и метаболический синдром. В этом контексте предположили, что увеличение концентрации *Clostridiales* может привести к увеличению продукции кишечного бутирата, который, как было показано, вызывает висцеральную гиперчувствительность (42) и способствует сенсорной дисфункции, типичной для IBS (43). Кроме того, высокие концентрации фекального бутирата, ацетата и пропионата у женщин коррелировали с факторами риска метаболического синдрома (44). Значительно высокие концентрации бутирата были также обнаружены у детей с ожирением (45) и мышей (46). Кроме того, снижение потребления углеводов взрослыми, страдающими ожирением, привело к потере веса, снижению концентрации бутирата и уменьшению количества бактерий, продуцирующих бутират, в фекалиях (47). Следовательно, в свете результатов исследований, представленных выше, мы можем предположить, что наблюдаемая способность *L. paracasei* DG «сбалансировать» концентрации бутирата (т. е. уменьшить концентрацию бутирата, когда его концентрация высока, и увеличить его, когда она низкая) может защитить хозяина от этих физиологических состояний, связанных с изменением концентрации бутирата (41-47).

Производство витаминов (например, витамина К, витамина В-12, и фолата) является одной из самых известных ключевых метаболических функций кишечных бактерий. Используя вычисления для прогнозирования метагенома по филогенетическому профилированию микробиоты, мы оценили, что потребление *L. paracasei* DG может значительно увеличить количество генов, которые, как ожидается, будут участвовать в производстве фолата. Несколько исследований описали способность пробиотических бактерий производить фолат и служить потенциальным источником фолиевой кислоты для потребителя (48). Несколько генов, предположительно участвующих в синтезе фолата, также присутствуют в геноме штамма *L. paracasei* DG в капсулах *Enterolactis*. Кроме того, наши результаты

показали, что пробиотики, помимо прямого производства фолата, могут косвенно способствовать доступности витаминов в организме хозяина путем модуляции микробиоты кишечника. В соответствии с этой гипотезой статистика, примененная к нашим вычислительным данным, показала, что кишечные бактерии, потенциально ответственные за модификацию прогнозируемого содержания генов, необходимых для биосинтеза фолата, являются членами родов, известных как носители генов, участвующих в биосинтезе фолата (например, из EFY05259 *Phascolarctobacterium* и ADE82633 в *Prevotella* базы генетических данных).

В заключение, необходимо сказать, что было проведено исследование PROBIOTA-DG для определения влияния пробиотических добавок на структуру микробиоты кишечника у здоровых взрослых людей. Несмотря на высокую межиндивидуальную изменчивость состава микробиоты, результаты показали, что 4-недельное потребление Энтеролактис Плюс, пробиотического продукта, содержащего штамм бактерий *L. paracasei* DG, изменяет местную микробную экологию (особенно популяции Clostridiales) и, вероятно, тем самым изменяет концентрации SCFA, особенно бутирата. Примечательно, что применение пробиотиков оказало балансирующее влияние на концентрацию SCFA, которая в значительной степени зависела от исходных характеристик микробной экосистемы кишечника. В том числе, фекальные концентрации бутирата представляют важный биомаркер для определения, кому из участников прием пробиотиков может принести пользу.

Выражение благодарности

Авторы благодарят Ella Pagliarini за помощь в проведении статистического анализа; S.G. и W.F. – дизайн исследования; C.F., V.T., M.S. и I.D.N. – проведение исследования; S.G., C.F., B.C., P.R., и M.L. – анализ данных и выполнение статистического анализа; C.M. и B.C. – проведение биостатистического анализа; S.G., C.F., и V.T. – написание рукописи; и S.G., который несет основную ответственность за окончательное содержание. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Ссылки на литературу

1. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario (Canada): WHO/FAO; 2002.
2. Guglielmetti S, Mora D, Gschwender M, Popp K. Randomised clinical trial: Bifidobacterium bifidum MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life—a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1123–32.
3. Shen J, Zuo ZX, Mao AP. Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:21–35.
4. Gibson GR, Brummer RJ, Isolauri E, Lochs H, Morelli L, Ockhuizen T, Rowland IR, Schrezenmeir J, Stanton C, Verbeke K. The design of probiotic studies to substantiate health claims. *Gut Microbes* 2011;2:299–305.
5. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr*. 2011; 6:209–40.
6. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:227–38.
7. Robles Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr* 2013;109 Suppl 2:S21–6.
8. Kim SW, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, Morita H, Hattori M. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res* 2013;20:241–53.
9. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 2011;6:261–74.

10. Tursi A, Brandimarte G, Elisei W, Picchio M, Forti G, Pianese G, Rodino S, D'Amico T, Sacca N, Portincasa P, et al. Randomised clinical trial: mesalazine and/or probiotics in maintaining remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease—a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38: 741–51.
11. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, Modeo ME. Effect of *Lactobacillus casei* supplementation on the effectiveness and tolerability of a new second-line 10-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. *Med Sci Monit* 2004;10: CR662–6.
12. D'Inca` R, Barollo M, Scarpa M, Grillo AR, Brun P, Vettorato MG, Castagliuolo I, Sturniolo GC. Rectal administration of *Lactobacillus casei* DG modifies flora composition and Toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2011;56:1178–87.
13. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220–30.
14. Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, Azpiroz F, Roca J, Guarner F, Manichanh C. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol* 2012;12:158.
15. Milani C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, Sanchez B, Martin R, Gueimonde M, van Sinderen D, et al. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS ONE* 2013;8:e68739.
16. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335–6.
17. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5069–72.
18. Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkpile DE, Vega Thurber RL, Knight R, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 2013;31:814–21.
19. Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* 2011;5:169–72.
20. Rastogi G, Sani RK. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J, editors. *Microbes and microbial technology*. New York: Springer; 2011. p. 29–57.
21. Chinda D, Nakaji S, Fukuda S, Sakamoto J, Shimoyama T, Nakamura T, Fujisawa T, Terada A, Sugawara K. The fermentation of different dietary fibers is associated with fecal clostridia levels in men. *J Nutr* 2004;134:1881–6.
22. Gosalbes MJ, Durban A, Pignatelli M, Abellan JJ, Jimenez-Hernandez N, Perez-Cobas AE, Latorre A, Moya A. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS ONE* 2011;6:e17447.
23. Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, Moya A, D'Auria G. The active human gut microbiota differs from the total microbiota. *PLoS ONE* 2011;6:e22448.
24. Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS ONE* 2013;8:e68322.
25. McHardy IH, Li X, Tong M, Ruegger P, Jacobs J, Borneman J, Anton P, Braun J. HIV infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota. *Microbiome*. 2013;1:26.
26. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 2011;25:397–407.
27. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, Becker AB, Scott JA, Kozyrskyj AL. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013;9:15.
28. Liu C, Finegold SM, Song Y, Lawson PA. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58: 1896–902.
29. Malinen E, Rinttila T, Kajander K, Matto J, Kassinen A, Krogius L, Saarela M, Korpela R, Palva A. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol* 2005;100:373–82.
30. Parkes GC, Rayment NB, Hudspith BN, Petrovska L, Lomer MC, Brostoff J, Whelan K, Sanderson JD. Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:31–9.
31. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3380–9.

32. Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, de Vos WM. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:1792–801.
33. Lyra A, Rinttila T, Nikkila J, Krogius-Kurikka L, Kajander K, Malinen E, Matto J, Makela L, Palva A. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification. *World J Gastroenterol* 2009;15:5936–45.
34. Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, Huttenhower C, Ley RE. A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLOS Comput Biol* 2013;9:e1002863.
35. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207–14.
36. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174–80.
37. Tyakht AV, Kostyukova ES, Popenko AS, Belenikin MS, Pavlenko AV, Larin AK, Karpova IY, Selezneva OV, Semashko TA, Ospanova EA, et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun* 2013;4:2469.
38. McOrist AL, Miller RB, Bird AR, Keogh JB, Noakes M, Topping DL, Conlon MA. Fecal butyrate levels vary widely among individuals but are usually increased by a diet high in resistant starch. *J Nutr* 2011;141:883–9.
39. Goossens D, Jonkers D, Russel M, Stobberingh E, Van Den BA, Stockbrugger R. The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:495–505.
40. Matsumoto K, Takada T, Shimizu K, Moriyama K, Kawakami K, Hirano K, Kajimoto O, Nomoto K. Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on defecation frequency, intestinal microbiota, and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools. *J Biosci Bioeng* 2010;110:547–52.
41. Leonel AJ, Alvarez-Leite JI. Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012;15:474–9.
42. Bourdu S, Dapoigny M, Chapuy E, Artigue F, Vasson MP, Dechelotte P, Bommelaer G, Eschalier A, Ardid D. Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* 2005;128:1996–2008.
43. Jeffery IB, O'Toole PW, Ohman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, Simren M. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 2012;61:997–1006.
44. Teixeira TF, Grzeskowiak L, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL, Peluzio MC. Higher level of faecal SCFA in women correlates with metabolic syndrome risk factors. *Br J Nutr* 2013;109:914–9.
45. Payne AN, Chassard C, Zimmermann M, Muller P, Stinca S, Lacroix C. The metabolic activity of gut microbiota in obese children is increased compared with normal-weight children and exhibits more exhaustive substrate utilization. *Nutr Diabetes*. 2011;1:e12.
46. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027–31.
47. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1073–8.
48. LeBlanc JG, Laino JE, del Valle MJ, Vannini V, van Sinderen D, Taranto MP, de Valdez GF, de Giori GS, Sesma F. B-group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol* 2011;111: 1297–309.