

Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическими методами

Осипов Г.А.¹, Парфенов А.И.², Верховцева Н.В.³,

Ручкина И.Н.², Курчавов В.А.⁴, Бойко Н.Б.¹, Рогатина Е.Л.⁴

¹ Научный центр сердечно-сосудистой хирургии, Академическая группа академика РАМН Ю.Ф. Исакова, ²Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии, ³Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, ⁴Детская городская клиническая больница №13 им. Н.Ф. Филатова

Ключевые слова: пристеночная микрофлора кишечника человека, хромато-масс-спектрометрический метод, жирные кислоты, биоптаты слизистой оболочки тощей, подвздошной и ободочной кишок, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона, антибиотикоассоциированная диарея.

В организме человека обитает более 500 видов микробов. Их общая численность составляет 10^{14} , что в 10 раз превышает число клеток человека. Большая часть микробов в количестве 1-2 кг сосредоточена в кишечнике ^{Luckey, 1987}. Понятно, что традиционные методы исследования 10–15 видов микрофлоры фекалий не в состоянии отразить реальную картину качественного и количественного состава микрофлоры кишечника.

Развитие в последнее десятилетие молекулярных методов микробиологических исследований дает возможность расширить сведения о видовом составе микробиоты кишечника. Молекулярно-генетический метод гибридизации 16 S r РНК ^{Hopkins, 2001}, в том числе в сочетании с градиентным гель-электрофорезом (DGGE) денатурированных ПЦР-фрагментов (ампликонов) r ДНК ^{Favier, 2002} применен для контроля бактериальных групп и отдельных видов бактерий (до 18 таксонов) в фекалиях. Метод видоспецифичен, но трудоемок и малодоступен ввиду необходимости индивидуального подбора тестовых олигонуклеотидов для каждой реакции амплификации, либо процедуры клонирования неспецифичных ПЦР-продуктов с последующим секвенированием очищенных плазмид. Тем не менее, ПЦР–DGGE при наличии необходимых стандартов предлагается для мониторинга микроорганизмов в фекалиях.

Метод детектирования микроорганизмов по нелетучим жирным кислотам (ЖК) клеточной стенки микроорганизмов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС) сродни генетическому, поскольку состав ЖК

детерминирован в ДНК и воспроизводится путем репликации участка генома транспортными РНК и последующего синтеза ЖК в митохондриях по матричным РНК (Албертс, 1986). Поэтому профиль ЖК бактерий является их визитной карточкой или фингерпринтом, как отпечатки пальцев людей (Митрука, 1978). Он так же консервативен, как строение ДНК, но и так же подвержен мутациям под действием факторов окружающей среды. Стабильность набора жирных кислот, составляющих клетки микробов, подтверждается исследованиями в области бактериальной палеонтологии, которые показывают, что до глубины времен в 2,5 млрд лет состав ЖК отдельных микробов и пула их жирных кислот в целом остается постоянным (Шеховцова, 2002). В отличие от молекулярно-генетического этот метод позволяют быстро получить количественную информацию о большом спектре микроорганизмов ^{Lehtonen, 1995; ChemicalMethods., 1994; Stead,1992}. Метод основан на использовании очень больших баз данных, содержащих сведения о составе жирных кислот нескольких тысяч штаммов бактерий и микроскопических грибов. Особенности состава жирных кислот теперь используются наряду с другими параметрами в бактериальной таксономии ^{Определитель бактерий...,1997} и клинической бактериальной диагностике ^{Вейант, 1999}. Фирмой MIDI Inc., Делавер, США серийно выпускается хроматограф Microbial Identification System для автоматической идентификации микроорганизмов по составу ЖК чистой культуры клеток, выращенной в стандартных условиях ^{Stead, 1992}.

Ранее нами описаны примеры обнаружения микроорганизмов при инфекционных процессах методом ГХ-МС ^{Осипов, Демина, 1996}. Установлено наличие гомеостаза малых молекул микробного происхождения в крови человека, который нарушается при воспалениях ^{Белобородова, Осипов, 1999; Beloborodova, Osipov, 2000}.

Микробиота тонкого кишечника в гастроэнтерологии исследуется крайне редко, в основном при хирургическом вмешательстве. При этом определяют в основном ограниченный круг условно-патогенных микроорганизмов культурально-биохимическим методом в аэробных условиях. Чаще изменения нормальной микробиоты кишечника определяют по составу микроорганизмов в фекалиях. Однако, для оценки дисбиоза, более ценной является информация о микробной колонизации в стенке кишечника, которая обеспечивается адгезивными свойствами бактерий. В отличие от микрофлоры фекалий, именно эти микроорганизмы наиболее точно отражают состояние микробной экологии человека ^{Шендеров, 1998}. Микрофлора, обладающая адгезивными свойствами, является наиболее жизнеспособной. Она сосредоточена на апикальной мембране энтеро- и колоноцитов, т.е. в зоне ассимиляции нутриентов. Можно предполагать, что изменения ее качественного и количественного состава оказывают влияние на пищеварительно-транспортные процессы в тонкой кишке. Недавно были опубликованы результаты анализа специфических для микроорганизмов длиноцепочечных клеточных жирных кислот (ЖК) в биоптатах стенки тонкой, подвздошной и ободочной кишок (Осипов, 2001, Парфенов, 2001). Методом

газовой хроматографии – масс-спектрометрии определены ЖК из состава клеточной мембраны и липополисахарида микроорганизмов в биоптатах, полученных во время интестиноскопии и колоноскопии с ретроградной илеоскопией, у пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК) и здоровых добровольцев. Одновременно кровь пациентов с СРК исследована на содержание 135 таких веществ, что дает информацию о 170 таксонах микроорганизмов. На основании этих данных рассчитан состав пристеночной микробиоты разных отделов кишечника в сопоставлении с фекалиями и показана адекватность изменения микробных маркеров в крови при СРК.

Предлагаемая работа является продолжением этих исследований и содержит сведения о ряде новых родов микроорганизмов, включенных в алгоритм мониторинга в связи появлением данных по составу их жирных кислот и альдегидов. Эти сведения существенно расширяют возможности клинического приложения метода, так как дополняют результаты информацией по клостридиям, представителям рода *Eubacterium*, пропионобактериям и руминококкам. Кроме того, при посеве материала биоптатов на питательные среды подтверждено наличие в составе пристеночной микробиоты кишечника выделением в чистой культуре ряда бактерий, грибов и аэробных актиномицетов, определенных ранее по жирнокислотным маркерам. В связи с этим внесены коррективы в определение клинического значения изменений состава пристеночной микрофлоры кишечника человека при СРК и антибиотико-ассоциированной диарее (ААД).

Материал и методы исследования

Обследованы 31 больной с синдромом раздраженного кишечника с преобладанием поносов, 18 больных с урогенитальной инфекцией (15 чел), обострением хронического бронхита и очаговой правосторонней пневмонии (3), у которых лечение осложнилось антибиотикоассоциированной диареей и 3 больных болезнью Крона тонкой кишки. Контрольную группу составили 3 добровольца из числа призывников на военную службу.

Исследовали пробы крови и биоптаты слизистой оболочки тощей, подвздошной и ободочной кишок. Биоптаты (1-2 фрагмента слизистой оболочки общим весом до 8 мг) получали во время интестиноскопии и колоноскопии с ретроградной илеоскопией.

Для верификации метода – то есть для определения соотношения измеряемых концентраций микроорганизмов с данными измерений культуральным и молекулярно-генетическим методами проведено измерение состава фекалий здорового человека.

Принцип метода – молекулярный, основан на прямом определении в биопробе жирных кислот (ЖК) клеточной стенки микроорганизмов. Известно, что 200 микробных ЖК специфичны и обеспечивают определение состава микробиоты слизистых оболочек и очагов воспаления на преобладающем фоне 20 человеческих ЖК. Метод ГХ-МС и программа расчета обеспечивают количественный мониторинг микробиоты. База данных содержит сведения о профилях ЖК более 1000 видов бактерий, грибов и актиномицетов.

Подготовка пробы и условия культивирования микроорганизмов

Биоптатов. Биоптаты из стерильных пробирок, в которые производился их отбор при зондировании кишечника, асептически переносили в стерильную фарфоровую ступку и растирали с добавлением стерильной дистиллированной воды. Растертые биоптаты количественно переносили в пробирки с дистиллированной водой. Из разведений 10^{-4} – 10^{-5} производили посевы суспензий на РПА, РПА 1:10, кровяной агар, bile salt agar, yeast extract agar, starch agar. Чистые культуры микроорганизмов получали путем пересевов при контроле методом световой микроскопии. При анализе анаэробной составляющей кишечной микробиоты пробу сразу после извлечения зонда переносили в пробирку с угольной транспортной средой для анаэробов (фирма) и немедленно доставляли в бактериологическую лабораторию, где проводили посев в пробирку в толщу агаризованных сред или во флаконы ВАСТЕК для анаэробов. Из толщи агаризованных сред колонии вырезали, а взвесь клеток из жидкой среды предварительно центрифугировали. И то и другое подвергали кислоте метанолизу после подсушивания вместе с остатками среды. Цельную кровь в количестве 0,05 мл высушивали при добавлении метанола и подвергали кислоте метанолизу в 0,4 мл 1 М HCl в метаноле.

Газовая хроматография – масс-спектрометрия. Метанолиз биоптатов слизистой оболочки в количестве 3-4 мг, проводили в 0,4 мл 1 М HCl в метаноле в течение одного часа при 80 ° C. В результате реакции метанолиза сложных липидов жирные кислоты освобождаются в виде метиловых эфиров. Их двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали в 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 15 мин при 80 ° C для получения триметилсилильных эфиров гидроксикислот. Смесь эфиров в количестве 1 мкл вводили в инжектор ГХ-МС системы HP-5973 Аджилент технолоджис (США). Для управления и обработки данных использовали штатные программы прибора. Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5 ms Аджилент технолоджис. Режим анализа и обоснование принадлежности маркеров конкретным микроорганизмам осуществляли как описано ранее ^{Осипов, Парфенов, 2001}.

Площади пиков маркеров на масс-фрагментограммах интегрировали автоматически по заданной программе с использованием внутреннего стандарта.

Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах EXCEL. Для количественного расчета использовали данные калибровки по дейтерированной тридекановой кислоте и чистым культурам клинических изолятов микроорганизмов.

Идентификация микроорганизмов. В изолятах и анаэробных накопительных культурах определение вида микроорганизмов проводили на Microbial Identification System (MIDI . Inc ., Newark , Del .). Изоляты идентифицировали по коммерческой базе данных (MIDI , Inc .) объемом 1800 штаммов, а также с использованием собственной базы данных, включающей около 800 штаммов бактерий, аэробных актиномицетов и микроскопических грибов. ГХ-МС использовали для подтверждения данных хроматографии, идентификации неизвестных компонентов и анализа отдельных колоний, когда количество микроорганизмов оказывалось не достаточным для анализа на ГХ. Морфологию выделенных штаммов контролировали методом световой микроскопии окрашенных препаратов и методом сканирующей электронной микроскопии.

Расчет состава и количества эффективных клеток микроорганизмов. Площадь хроматографического пика маркера пропорциональна его концентрации а следовательно, концентрации соответствующего микроорганизма, которая определяется как число клеток N_1 в единице объема или веса пробы по формуле:

$N_1 = A_i \frac{M_{st}/(q_2 * M_{sam} * A_{st})}{R_{i1}}$, где выражение в квадратных скобках, постоянный коэффициент

$$k = M_{st}/q_2/M_{sam}/A_{st} = M_{st}(мг)/5,1 \times 10^{-15}г/M_{sam}(мг)/A_{st}$$

В этих формулах A_i – площадь пика маркера, M_{st} – количество введенного в пробу стандарта в мг, M_{sam} – соответственно, количество пробы, A_{st} – площадь пика стандарта, R_{i1} – доля в % маркера с индексом i в профиле ЖК определяемого микроба с номером 1 (N_1), q_2 – коэффициент, равный $5,1 \times 10^{-15}$ г, в котором содержится основополагающая в пересчете на число клеток величина $5,9 \times 10^{12}$ клеток микробов, содержащихся в 1г микробной биомассы и доля ЖК в клетке, принятая в среднем равной 3%.

Соответственно, число клеток любого следующего микроорганизма можно рассчитать по аналогичной формуле $N_2 = A_i \times k / R_{i2}$ и так далее, умножая площади пика A_i маркера, по которому проводятся вычисления, на коэффициент k и деля на долю маркера в % в составе ЖК этого микроорганизма.

Таким способом определяли эффективную (то есть соответствующую измеренной в данный момент концентрации маркера) численность бактерий видов *C. perfringens*, *C. difficile*, *Prevotella*, *Stenotrophomonas* грибов *Candida albicans*,

бактерий родов *Klebsiella*, *Eubacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Sphingo bacterium*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, сем. *Enterobacteriaceae* и других, а также неспецифически грибов по эргостеролу (*Aspergillus*, *Mucor* и др.). Некоторые бактерии и вирусы вмешиваются в синтез стерина в клетках человека, что позволяет определять бактерии рода *Eubacterium* по продукту трансформации человеческого холестерина ее ферментом в копростанол, вирусы герпеса неспецифически по индуцируемому ими метаболиту холестендиолу, цитомегаловирусы – по холестодиенону и изомерам холестадиена. Если вещество не обладает свойством маркера, то есть может быть отнесено к двум или более таксонам, то и в этом случае доля вклада каждого микроорганизма, если воспользоваться решением системы уравнений для двух (или, соответственно, более) веществ. Такой способ описан нами для расчета экологических микробных сообществ Турова, Осипов, 1996, при котором видовой состав микробного сообщества в общем виде для m веществ хроматограммы и n родов (видов) микроорганизмов можно вычислить, составив систему из m уравнений для n неизвестных:

$$A_1 \cdot k = N_1 R_{1,1} + N_2 R_{1,2} + N_3 R_{1,3} + \dots + N_n R_{1,n}$$

$$A_2 \cdot k = N_1 R_{2,1} + N_2 R_{2,2} + N_3 R_{2,3} + \dots + N_n R_{2,n}$$

$$A_3 \cdot k = N_1 R_{3,1} + N_2 R_{3,2} + N_3 R_{3,3} + \dots + N_n R_{3,n}$$

$$A_m \cdot k = N_1 R_{m,1} + N_2 R_{m,2} + N_3 R_{m,3} + \dots + N_n R_{m,n}$$

где A_i ($i=1,2,\dots,m$) – площадь пика ,

N_j ($j=1,2,\dots,n$) – число клеток микроорганизмов,

k – коэффициент пропорциональности,

R_{ij} – доля i -того вещества в профиле ЖК j -того микроба.

Результаты и обсуждение

Состав и численность пристеночной микробиоты кишечника в сопоставлении с фекалиями

Описанным выше методом определена заселенность слизистой оболочки кишечника (табл. 1), которая оказалась у здоровых людей по порядку величины одинаковой для тощей, подвздошной и толстой кишок ($0,6 - 1$) $\cdot 10^{11}$ кл/г и существенно меньше по сравнению с фекалиями ($2,7 \cdot 10^{11}$ кл/г). Полученная

численность для фекалий находится в пределах интервала значений 10^{11} - 10^{12} кл/г, известных из литературных данных (Маянский, Микробиология для врачей, 1999). Совпадает с известными оценками и относительное количество анаэробов в них, которое по нашим данным составляет 88%. Родовое распределение трудно сравнивать с литературными данными, так как в них приводится очень широкий диапазон значений, в пределах 3-6 порядков. Тем не менее, совпадает наша оценка о приоритете рода *Eubacterium*, численность которых имеет порядок 10^{11} кл/г (10^9 – 10^{12} по литературным данным), о количестве бациллоидов 10^{10} кл/г (10^{10} – 10^{12} по известным данным), клостридий – 6×10^{10} кл/г (10^5 – 10^{11} соответственно), бифидобактерий 10^{10} кл/г (10^{10} – 10^{12}), а также по энтерококкам, энтеробактериям, лактобациллам и стафилококкам. Этот результат позволяет утверждать, что анализ микробиоты фекалий методом ГХ-МС по жирным кислотам клеточной стенки микроорганизмов дает достоверные данные об их численности. Следовательно, можно считать так же достоверными приводимые здесь сведения о составе микроорганизмов в биоптатах кишечной стенки.

Таблица 1.

Состав микроорганизмов стенки кишечника и в фекалиях по группам

Группы и таксоны микроорганизмов	Численность, кл/г, ' 10^6			
	Тошная	Подвздошная	Ободочная	Фекалии
Кокки, бациллы, коринебактерии				
<i>Streptococcus</i>	261	253	1170	1691
<i>Bacillus cereus</i>	0	51	157	284
<i>Bacillus megaterium</i>	90	0	0	0
Corineform(<i>Listeria</i>) a17	1398	439	713	65
<i>Staphylococcus</i>	616	410	490	121
<i>Streptococcus</i>	1642	127	2	641
Сумма	4006	1281	2533	2803
Анаэробы				
<i>Eubacterium lentum</i>	98	675	670	4334
<i>Clostridium hystolyticum</i>	692	467	849	388
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	487	330	423	37
<i>Clostridium propionicum</i>	127	150	0	13942
<i>Bacteroides hypermegas</i>	0	0	0	163
<i>Clostridium ramosum</i>	3892	1942	118	0
<i>Fusobacterium/Haemophylus</i>	0	0	0	129
<i>Porphyromonas</i>	0	0	0	39
<i>Lactobacillus</i>	17355	17190	16231	30510
<i>Eubacterium moniliforme</i>	0	0	0	892
<i>Cl.difficile</i>	1769	861	1055	684
<i>Prevotella</i>	620	583	345	7557

Eubacterium/Enterococcus	6832	11497	24457	12026
Bacteroides fragilis	0	63	43	1340
Bifidobacterium	5249	7108	31886	10723
Clostridium perfringens	224	50	43	44698
Eubacterium	27	1548	3549	93218
Eubacterium sp	12777	1057	13086	3648
Propionibacterium acnes	0	0	359	388
Ruminicoccus	804	800	1364	30
E.lentum 7741	93	56	0	282
Bacteroides ruminicola	0	7	9	2769
Eubacterium spp.	365	265	5650	9725
Propionibacterium	0	0	0	698
Сумма	52520	44648	100138	238219
Аэробные актиномицеты				
Nocardia, 14:1d11	1595	0	1136	7
Актиномицеты	797	289	105	0
Pseudonocardia	215	7	85	34
Streptomyces	493	392	329	1522
Rhodococcus	1588	792	698	127
Mycobacterium/Candida	3025	3184	3257	0
Actinomadura	151	0	12	0
Nocardia asteroides	1782	0	609	108
Actinomycetes 10Me14	3652	3196	2328	92
Сумма	13297	7859	8558	1891
Грам (-) палочки				
Acinetobacter	0	0	0	125
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	42
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	0	24
Сумма	0	0	0	191
Энтеробактерии и энтерококки				
Klebsiella 2h14	146	261	190	84
Campylobacter mucosalis	0	0	0	18
E.coli	20	21	25	0
Helicobacter pylory, h18	529	141	92	2134
Enterococcus	783	484	1252	669
Enterococcus faecalis	0	0	530	4649
Сумма	1478	907	2089	7554
Микроскопические грибы				
Микр грибы (кампестерол)	216	375	112	1430
Микр грибы (ситостерол)	197	422	56	888
Микр грибы (эргостерол)	0	0	0	286
Сумма	413	797	168	2604

Вирусы				
Herpes	216	113	203	0
Цитомегаловирус	919	31	26	8
Сумма	1135	144	230	8
Не идентифицированы				
Маркер i14	0	840	92	15192
Маркер i17	3066	1549	0	2061
Сумма	3066	2389	92	17253
Общая сумма	75915	57772	112637	270523

По данным табл. 1 общая удельная численность микроорганизмов в пристеночном слое ободочной кишки (далее будем говорить просто в ободочной или другой кишке, имея в виду биоптат кишечной стенки вместе с мукозным слоем) в два с половиной раза меньше, чем в фекалиях, но доля анаэробов также составляет 89%. Однако родовой состав внутри группы анаэробов иной, чем в фекалиях. На стенке больше втрое концентрация бифидобактерий, но меньше лактобацилл и эубактерий. Причем, у последних изменен и видовой состав по сравнению с фекальным. Интересно отметить, что концентрация *S. perfringens* на три порядка меньше в пристеночном слое как ободочной, так и подвздошной кишки, чем в фекалиях, но снова увеличивается в тощей. Это означает практически, что фекалии являются основным местообитанием этих бактерий, а также *S. propionicum*. Другие клостридии, *S. hystolyticum* и *S. difficile* сохраняют порядок величины по отделам кишечника и в фекалиях (около 10^3), а *S. ramosum* не обнаруживается в фекалиях, но ее численность растет от 10^8 в ободочной до 10^9 в тощей кишке. Следующей по численности группой в фекалиях являются факультативные анаэробы – энтеробактерии и энтерококки, в основном, за счет *E. faecalis*, который не обнаруживается в подвздошной и тощей кишках, тогда как прочие энтерококки, хеликобактер и клебсиеллы равномерно заселяют кишечник и фекалии. *E. coli* и другие бактерии сем. *Enterobacteriaceae* в норме обнаруживаются методом ГХ-МС только в кишечной стенке, а *Campylobacter mucosalis* – только в фекалиях.

Существенную долю микробиоты тощей кишки ($1,3 \times 10^{10}$ кл/г, в фекалиях – на порядок меньше) составляют аэробные актиномицеты. В предыдущей работе, при неполном учете анаэробов, их доля оказалась относительно завышенной – около 50% вместо 17% по данным табл 1. В специализированных лабораториях подтверждено их наличие на слизистых оболочках и коже человека и животных, а также их участие в воспалительных процессах. Они не доступны рутинному контролю в рядовых клинических лабораториях, однако, благодаря наличию уникальных молекулярных маркеров могут быть обнаружены и количественно измерены методом масс-спектрометрии. Далее по численности следуют аэробные

кокки (стафилококки, стрептококки, энтерококки и коринеформные бактерии) – около 5% в тощей кишке и 1% в фекалиях.

Плотность заселения стенки кишечника в дистальном направлении меняется мало: в подвздошной кишке она в два раза меньше, а в толстой в полтора раза больше, чем в тощей. Измеренная нами пристеночная микрофлора оказалась существенно более концентрированной, чем просветная (по литературным данным (Маянский, Микробиология для врачей, 1999), , которая в тонкой кишке на шесть порядков ниже по численности (до 10^5 кл/мл,), в подвздошной кишке – на порядок выше.

Неожиданным результатом, несомненно, является обнаружение значительного количества аэробных актиномицетов. Специфичность их маркеров – разветвленных жирных кислот с метильной группой в положении $\Delta 10$ не позволяет предполагать какие-либо иные таксономические группы микроорганизмов, кроме представителей порядка Actinomycetales , содержащих в составе клеточной стенки миколовые кислоты, являющиеся источником 10-метилразветвленных ЖК. Они содержатся в микобактериях, нокардиях, родокках, *Actinomadura* spp. и других актиномицетах, но не найдены у высших организмов (в грибах, растениях, животных). Присутствие этих молекул в биоптатах кишечника, крови и других органах и жидкостях человека подтверждается масс-спектрами в хроматографическом пике и относительным хроматографическим временем удерживания, а также их анализом в составе музейных культур соответствующих микроорганизмов. Бактерии родов *Streptomyces* и *Nocardiosis* подтверждены также уникальным маркером изо-гексадекановой кислотой (i 16). Кроме того, профиль разветвленных ЖК специфичных для стрептомицетов выявлен в крови септических больных в нашей практике, а *Nocardiosis dassonvilley* выделен в чистой культуре из кишечника в настоящем исследовании. Список актиномицетов на самом деле шире, чем это показано в первой группе табл. 7. Сюда следует добавить анаэробные актиномицеты и близкие к ним микроорганизмы. Это *Propionibacterium* , *Actinomyces* , *Brevibacterium* , которые также выделены в чистой культуре и коринеформные бактерии. Наконец, если учесть, что до настоящего времени в некоторых руководствах по микробиологии, как и ранее Определитель бактерий..., 1997 , род *Bifidobacterium* относят к семейству Actinomycetaceae , то окажется, что актиномицеты занимают существенное место в пристеночной микробиоте кишечника. Такая оценка повышает значимость микробиоты кишечника для организма хозяина, так как актиномицеты превосходят все прочие микроорганизмы по продукции антибиотиков и витаминов и обладают мощным ферментативным аппаратом. Высокая степень колонизации кишечника актиномицетами не выглядит необычным явлением, если иметь в виду, что актиномицеты широко распространены в окружающей среде – почве, воде, воздухе, на внутренних стенах жилых и производственных помещений. Их обитание в организме человека при таких обстоятельствах выглядит естественным. Действительно, в руководствах по клинической микробиологии отмечается

обнаружение актиномицетов и родственных организмов, таких как *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium* в кишечнике и других органах человека. Там они известны (в том числе и бифидобактерии) как участники инфекционных и воспалительных процессов. Однако эти проявления актиномицетов (патогенность, чувствительность к антибиотикам, способы лечения) являются предметом единичных специализированных лабораторий и клиник в мире. Трудности в их бактериальной диагностике и культивировании послужили препятствием широкой известности этих микроорганизмов в клинической практике. В том числе при многочисленных заболеваниях, связанных с изменением микробиоты кишечника.

При периодическом посеве биоптатов разных пациентов на питательные среды в аэробных условиях было выделено 52 штамма бактерий, аэробных актиномицетов, дрожжей и грибов. По данным световой и электронной микроскопии колоний, биохимическим тестам, профилям жирных кислот при подтверждении идентификации методом ГХ-МС выявлено 27 таксонов на уровне рода или вида (в скобках – число видов): Таблица 2

Перечень родов микроорганизмов, выделенных в чистом виде и идентифицированных при посеве биоптатов кишечника на питательные среды (в скобках – число видов, если больше одного)

- | | | |
|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| • <i>Acinetobacter</i> | • <i>Candida</i> (2) | • <i>Nocardiosis</i> |
| • <i>Actinomyces</i> | • <i>Chryseobacterium</i> | • <i>Ochroactrum</i> |
| • <i>Alcaligenes</i> | • <i>Citrobacter</i> | • <i>Penicillium</i> |
| • <i>Aspergillus</i> | • <i>Comamonas</i> | • <i>Peptostreptococcus</i> |
| • <i>Bacillus</i> (8) | • <i>Enterococcus</i> | • <i>Propionibacterium</i> |
| • <i>Bacteroides</i> | • <i>Enterobacter</i> | • <i>Pseudomonas</i> (3) |
| • <i>Bifidobacterium</i> | • <i>Helicobacter</i> | • <i>Proteus</i> |
| • <i>Brevibacterium</i> | • <i>Lactobacillus</i> | • <i>Stenotrophomonas</i> |
| • <i>Campylobacter</i> | • <i>Leiconostoc</i> | • <i>Streptococcus</i> |

Идентификация проведена по профилям клеточных жирных кислот. Часть изолятов идентифицировали для проверки культурально-биохимическим методом (табл. 3)

Таблица 3

Сопоставление данных идентификации микроорганизмов кишечной стенки культурально – биохимическим и хроматографическим методами

Штамм

ГХ-система Шерлок

Биохимический метод

2A	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>P.aeruginosa</i>
3B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>S.maltophilia</i>
2B	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
3A	<i>Chriseobacterium meningosepticum</i>	<i>Ch.meningosepticum</i>
1B	<i>Enterobacteriaceae sps</i>	<i>E.cloacae</i>
4A	<i>Bacillus atrophacus</i>	Грам+ палочки
1 A	<i>Alcaligenes xylosooxydans</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
3C	<i>Ochrobactrum anthropii</i>	<i>O . anthropii</i>

Микрофотографии приведены на рис 1(микроскопический гриб) и 2 (актиномицет *Nocardiosis dassonvillei*).

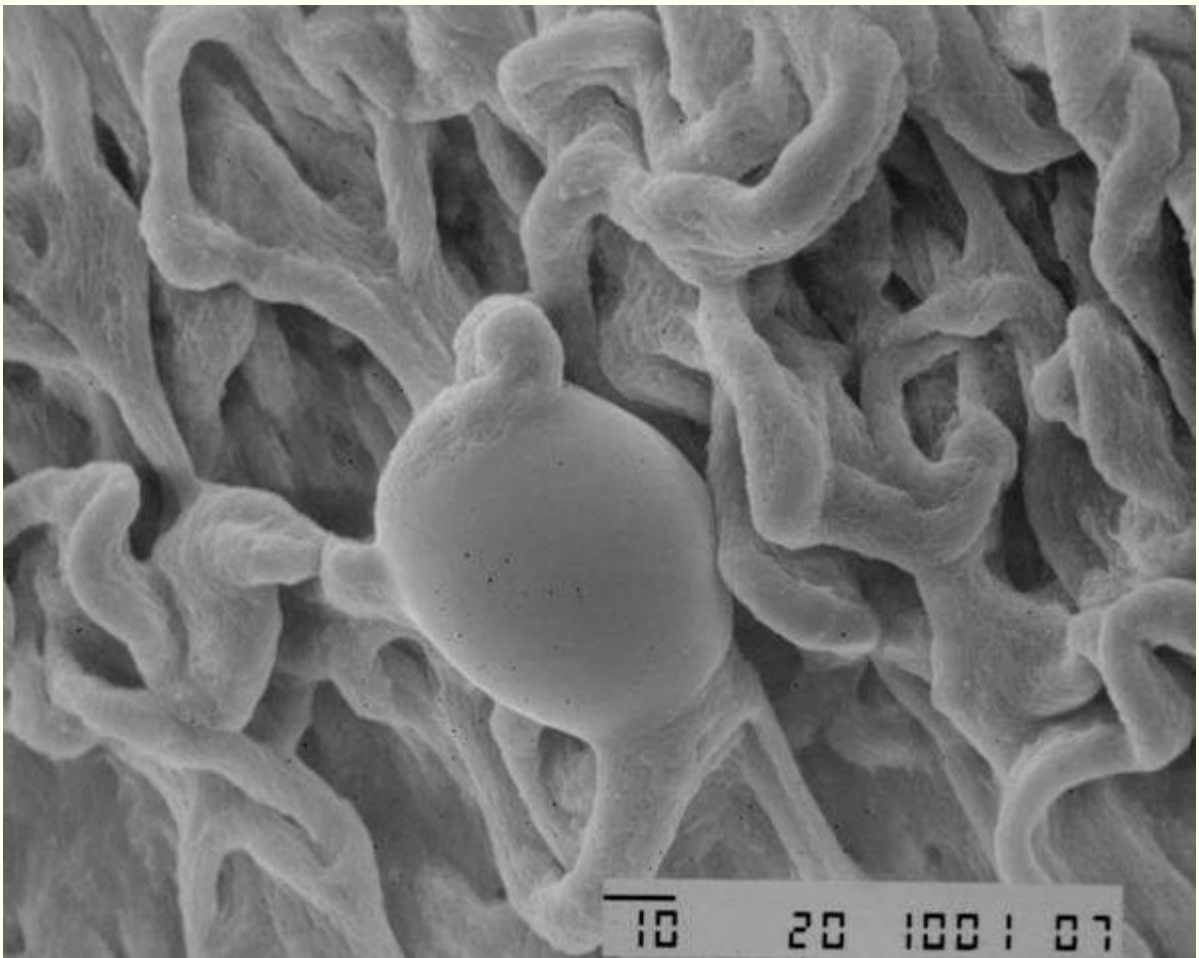


Рис 1. Микрофотография гриба из пристеночного слоя кишечника. Сканирующий электронный микроскоп.

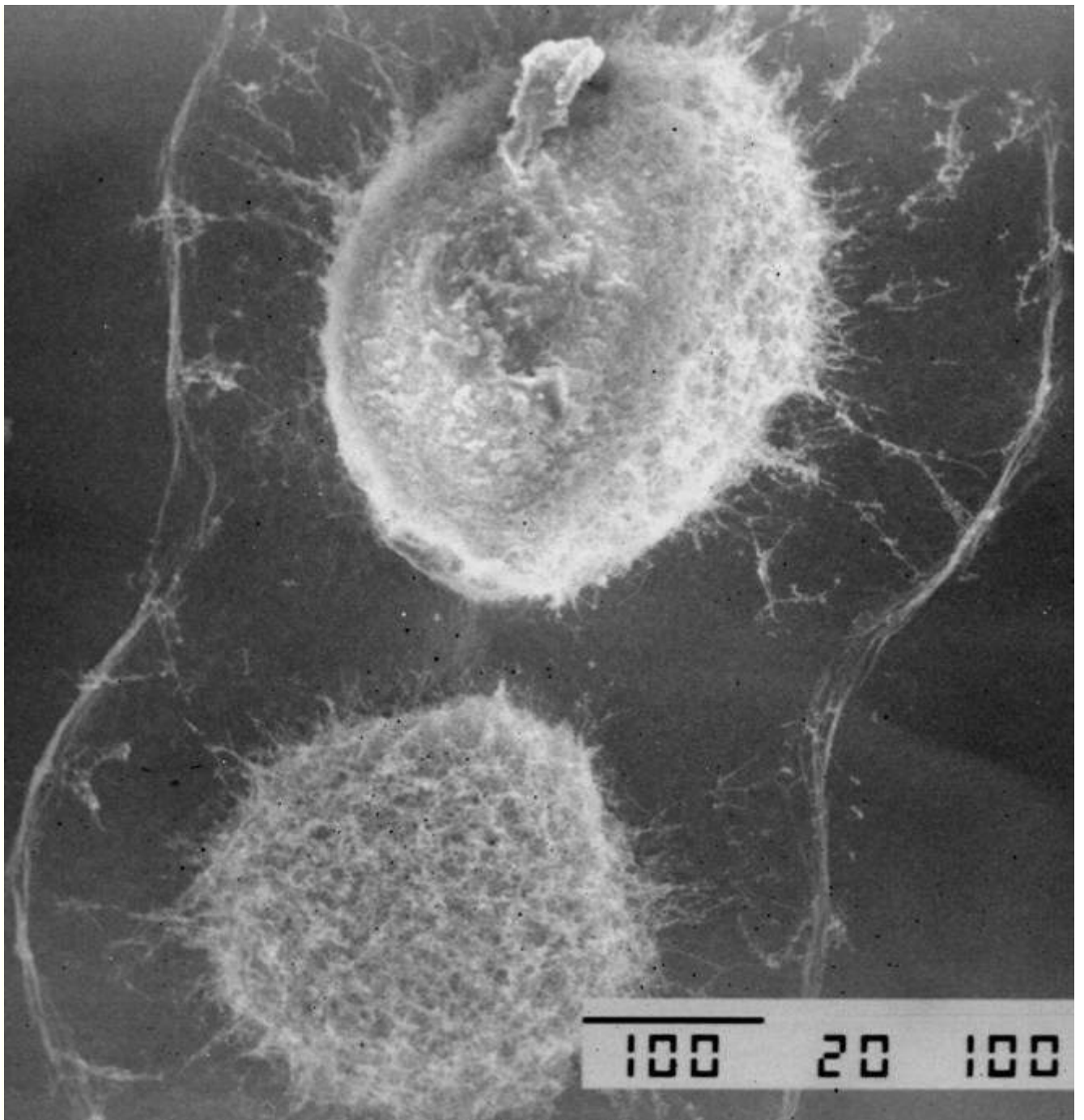


Рис 2. Микрофотография двух колоний аэробного актиномицета *Nocardioopsis dassonvillei* из пристеночного слоя кишечника. Сканирующий электронный микроскоп.

В таблицу 2 включены два представителя анаэробной микрофлоры: *Peptostreptococcus anaerobius*, выделенный в анаэроостате и *Actinomyces viscosus*, выявленный в накопительной культуре при посеве в бутылочки ВАСТЕС на среду для анаэробов. Эти организмы определены методом ГХ-МС по составу ЖК.

Обнаружены маркеры бактерий группы *Bacteroides fragilis* (3 h 17, 3 h 16 и i 15) и лактобацилл (16:1 DMA и 19 сус 11,12). Им сопутствуют аэробы *Stenotrophomonas* (маркер i 11:0), *Eikenella* (предполагается по паре маркеров 3 h 10 и 3 h 12 при отсутствии 2 h 12), и представители семейства *Enterobacteriaceae*, судя по одновременному присутствию их известных маркеров: β -оксимиристиновой кислоты (3 h 14), цис-вакценовой (18:1 w 7) и циклогептадекановой кислоте (17 сус). В другой пробе удалось выявить *Propionibacterium avidum* по профилю разветвленных жирных кислот – этот микроб был выделен и при посеве в аэробных условиях, поскольку является аэротолерантным организмом. Основная часть профиля жирных кислот этой пробы (прямоцепочечные ЖК) наиболее близка к *Pseudomonas alcaligenes*.

Изменение микрофлоры тонкой кишки при ААД

У 17 больных ААД исследованы 50 микроорганизмов, концентрация которых определена по молекулярным маркерам непосредственно в биоптате слизистой оболочки кишки (табл 4). Существенные (более чем в два раза) отклонения в численности колонизации претерпевают многие микроорганизмы – 13 из 55 контролируемых. Особенно часто увеличивается концентрация *Streptococcus* (14 из 17), *Eubacterium lentum* (12), *Bacillus cereus* (12), *Acinetobacter* (10), *Pseudomonas aeruginosa* (12), *Campylobacter mucosalis* (12), *Eubacterium/Enterococcus* (11), *Bacteroides fragilis* (10), *Eubacterium* (10), *Propionibacterium acnes* (15) и микроскопических грибов (10), продуцирующих ситостерол и кампестерол. Увеличение численности *Cl. difficile* не наблюдалось. Но обнаруживали превышение нормы колонизации *Cl. Perfringens* (6 из 17) и *Cl. propionicum* (5 из 17). Однако, основной тенденцией синдрома является уменьшение численности большинства микроорганизмов, – 25 из 55 контролируемых более чем в 50% случаев. Регулярно уменьшалась численность анаэробного пептострептококка, большинства видов эубактерий, энтеробактерий и аэробных актиномицетов. Отсюда следует, что причиной ААД является не определенный инфекционный агент, в частности, *Cl. difficile*, а скорее неспецифическое изменение нормальной микрофлоры тощей кишки. Такая ситуация представляется более правдоподобной по сравнению с моноэтиологичным вариантом. Действительно, пациенты принимали различные антибиотики и трудно представить, что у всех оказывался резистентным только один оппортунистический микроорганизм – *Cl. difficile*.

Таблица 4

Количество случаев более чем двукратного превышения нормы (>2 N) численности микроорганизмов в тонком кишечнике и соответственно ее уменьшения более чем вдвое (<0,5 N) при СРК и ААД

	ААД (n=17)	СРК (n=30)
--	------------	------------

	Микроорганизм	>2N	<0.5N	>2N	<0.5N
1	Streptococcus	14		23	
2	Eubacterium lentum, i16a	12		23	
3	Bacillus cereus	12		19	
4	Баланс	5	0	11	0
5	Clostridium hystolyticum	2	15	3	26
6	Nocardia, 14:1d11	4	11	7	20
7	Peptostreptococcus anaerobius	0	17	1	30
8	Acinetobacter	10	0	18	0
9	Pseudomonas aeruginosa	12	0	22	0
10	Propionibacterium	2	0	3	0
11	Bacillus megaterium	1	16	2	29
12	Clostridium propionicum	5	9	9	14
13	Stenotrophomonas maltophilia	4	0	8	0
14	Bacteroides hypermegas	2	0	3	0
15	АКТИНОМИЦЕТЫ	0	16	1	29
16	Pseudonocardia	5	8	8	16
17	Streptomyces	3	12	5	24
18	Clostridium ramosum	4	13	8	23
19	Fusobacterium/Haemophilus	0	0	6	0
20	Klebsiella 2h14	3	4	5	12
21	Репер	0	0	0	0
22	Flavobacterium	4	0	11	0
23	Rhodococcus	2	12	3	23
24	Баланс	10	0	18	0
25	Porphyromonas	7	0	15	0
26	Corineform(Listeria) a17	2	10	4	16
27	Lactobacillus	4	10	7	14
28	Campylobacter mucosalis	12	0	22	0
29	Mycobacterium/Candida	1	13	3	23
30	E.coli	3	13	10	19
31	Eubacterium moniliforme	3	0	6	0
32	Cl.difficile	1	12	3	20
33	Actinomadura	0	13	3	24
34	Prevotella	0	17	1	29
35	Eubacterium/Enterococcus	11	3	18	7
36	Bacteroides fragilis	10	0	15	0
37	Staphylococcus	2	6	7	11
38	Bifidobacterium	5	6	6	10
39	Helicobacter pylory, h18	0	0	1	0
40	Clostridium perfringens	6	7	9	16
41	Enterococcus	3	5	10	10
42	Eubacterium	10	1	21	3
43	Eubacterium sp. A17a	3	7	7	11
44	Streptococcus	1	12	2	20
45	Herpes	5	8	9	16

46	Микр грибы	10	6	16	10
47	Nocardia asteroides	3	9	7	16
48	Цитомегаловирус	0	16	2	28
49	Микр грибы	9	3	20	5
50	Propionibacterium acnes	15	0	27	0
51	Ruminococcus	7	6	14	11
52	Actinomyces 10Me14	0	16	1	29
53	E.lentum 7741, 14a	1	15	2	28
54	Enterococcus faecalis	5	0	9	0
55	Bacteroides ruminicola	0	0	0	0
56	Eubacterium spp.	2	10	6	18
57	Микр грибы	0	0	0	0

Изменение микрофлоры тонкой кишки у больных СРК с преобладанием диареи

Как видно из табл 4 при СРК наблюдаются такие же изменения, как и в случае ААД. Обследовано большее число пациентов, но значительная часть из группы ААД входит в группу больных с синдромом раздраженного кишечника. В связи с этим можно высказать предположение, что СРК с преобладанием поносов является одним из последствий интенсивного лечения антибиотиками. Все перечисленные микроорганизмы являются естественными обитателями кишечника, поэтому в пределах чувствительности метода (в данном случае 10^5 кл/г) фактически наблюдается изменение количественного состава микроорганизмов, колонизирующих в норме кишечник, что обычно называется дисбиозом.

Как показывают параллельные измерения концентрации микробных маркеров в крови у тех же пациентов, у которых исследовались биоптаты тонкого кишечника, тенденция изменения их концентрации совпадает. На *рис. 3* сопоставлены данные измерений маркеров бактерий в биоптате тощей кишки и в крови у больного СРК. На анализ взяты: биоптат слизистой кишечника – 4 мг и кровь из пальца – 50 мг. Как правило, концентрация микробных маркеров меняется синхронно в крови и слизистой оболочке кишечника, что позволяет предположить возможность оценки дисбиоза по составу молекулярных компонентов микроорганизмов в крови, что практически реализовано в рутинной диагностике.

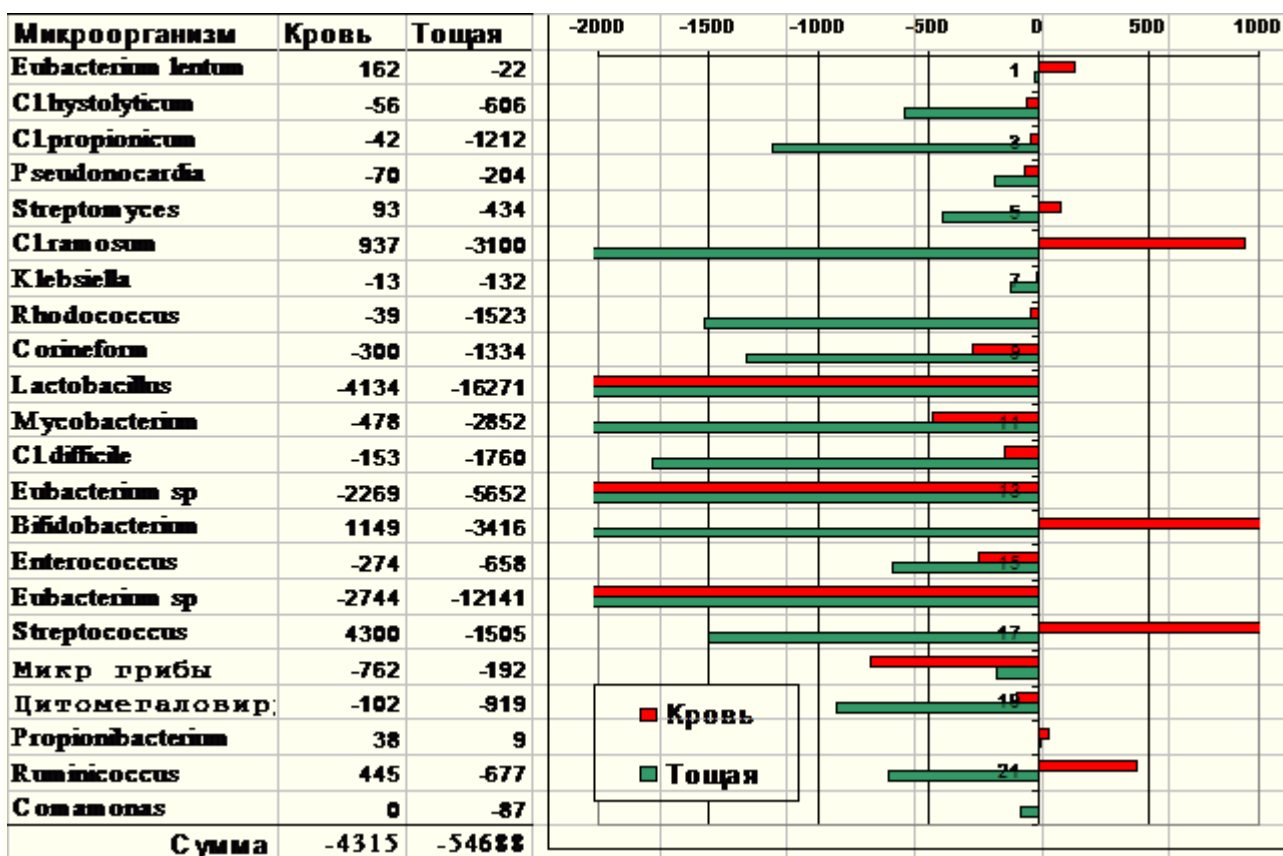


Рис 3. Сопоставление дисбиоза кишечника по микробным маркерам в крови и в биоптате тощей кишки (клеток/мл $\times 10^6$). Противофазные кишечнику изменения концентрации маркеров *Cl. Ramosum*, бифидобактерий, стрептококков и руминококков связаны с их доминирующим избыточным ростом в толстом кишечнике.

Выводы

1. Полученная численность для фекалий находится в пределах интервала значений 10^{11} - 10^{12} кл/г, известных из литературных данных. Этот результат позволяет утверждать, что анализ микробиоты фекалий методом ГХ-МС по жирным кислотам клеточной стенки микроорганизмов дает достоверные данные об их численности. Следовательно, можно считать так же достоверными полученные сведения о составе микроорганизмов в биоптатах кишечной стенки.
2. Состав микробиоты существенно и специфически меняется при заболеваниях кишечника. Возможность его количественного и экспрессного мониторинга методом ГХ-МС (в том числе – по крови) дает возможность выбора адекватного лечения и контроля его эффективности.

3. Следует обратить внимание на существенную долю эубактерий (род *Eubacterium*) среди других микроорганизмов кишечника (27% в тощей и 16% в ободочной кишках) и их специфическое видовое изменение при заболеваниях. Учитывая их физиолого-биохимическую активность, можно ожидать не меньшего, чем от регуляции численности бифидобактерий и лактобацилл эффекта на лечение кишечных патологий.
4. Концентрация стрептомицетов, родококков и других представителей порядка *Actinomycetales* в десятки раз увеличивается и/или уменьшается при патологических состояниях. Представляется перспективной разработка и использование для нормализации микробиоза кишечника пробиотиков и пребиотиков на основе этой группы (а также других) бактерий.
5. Увеличение в десятки раз концентрации маркеров лактобацилл и бифидобактерий при некоторых болезнях побуждает к дифференцированному применению широко распространенных пробиотиков на основе этих бактерий.

Литература

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М. Мир. 1986.
2. Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином. Вестник РАМН. –1999. Т.16, –№7, с. 25-31.
3. Вейант Р., Мосс У., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий. М. Мир, 1999, С. 612-783
4. Маянский . 1999. Микробиология для врачей.
5. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М. Медицина, 1978.
6. Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж.Хоулта и др. М.Мир, 1997, т.1,2, 638с.
7. Осипов Г.А. Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах. Вестник РАМН. –1996. Т.13, №2, с.52-59.

8. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Богомолов П.О. Сравнительное хромато-масс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и биоптатах слизистой оболочки кишечника. *Российский гастроэнтерол.журнал.* 2001, 1: 54-69.
9. Парфенов А.И., Осипов Г.А., Богомолов П.О. 2001. Дисбактериоз кишечника: новые подходы к диагностике и лечению. *Consilium medicum.* 3 (6), 270-272.
10. Турова Е.С., Осипов Г.А. Изучение структуры микробного сообщества, активного в биотрансформации минералов железа в каолине. *Микробиология,* 1996, 65(5), 682-689.
11. Шендеров Б.А., Медицинская микробная экология и функциональ Том 1: Микрофлора человека и животных и ее функцию– М: Издательство ГРАНТЬ, 1998 , – 288 с .
12. Шеховцова Н.В., Осипов Г.А., Верховцева Н.В., Певзнер Л.А. Анализ липидных биомаркеров в породах архейского кристаллического фундамента. Международная конференция по бактериальной палеонтологии. Тезисы докладов. Москва, 24-25 мая 2002г.
13. *Chemical Methods in Procariotic Systematics (1994) (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.), John Willey and Sons, .Chiduster, UK .*
14. Beloborodova N.V., Osipov G.A. 2000. Small molecules originating from microbes(SMOM) and their role in microbes-host relationship. *Microb. Ecol.Heal.Dis., SCUP,* 12: 12-21.
15. Brondz I. , Olsen I. (1991) Multivariate analyses of cellular fatty acids in *Bacteroides, Prevotella , Porhyromonas, Wolinella* and *Campylobacter spp* . *J.Clin.Microb., V 29 (1):* 183-89.
16. Dennemont J., Roupas A., Heitz M. Differentiation of *Campylobacter jejuni , C.coli , C.lary* and *C.fetus* fatty acid profiles obtained by gas chromatography – mass spectrometry and by their hippurate hydrolysis. // *Mitt. Geb.Lebensmittelunters.Hyg.– 1992.-Vol.83.-N2.-P.142-150.*
17. Favier C.F., Vaugham E.E., De Vos V.M., Akkermans A.D.L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl.Environ.Microbiol., 68 (1)* 219-226.
18. Hart CA . Antibiotic resistance: An increasing problem? *Br Med J* 1998;316:1255-6 (editorial) .

19. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* Feb;48(2):198-205
20. Lehtonen L., Eerola E., Oksman P. Muramic acid in peripheral blood leukocytes of healthy human subjects. *J.Infect.Dis.* 1995. 171, 1060-1064. .
21. Luckey T.D. 1987. Overview of gastrointestinal microecology. *Die Narung*, vol.31,N 5-6.
22. McNabb A., Shuttleworth R., Behme R. et al. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. *J.Clin.Microbiol.* 1997, v.35, N.6, p.1361-1368.
23. Stead, D.E., Sellwood, J.E., Wilson, J., et al. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria.// *J.Appl.Bacteriol.* 1992, 72, 315-321.

Копии:

info@tyres.spb.ru, trvlbureau@lens.spb.ru, unimet@land.ru, bik-m@mail.ru, <info1@rosma.spb.ru>, <olegmat@list.ru>, <olegmat@rosma.spb.ru>, <interst06@mail.ru>, <soros_84@mail.ru>, <zavs_tabeev@mail.ru>, <td_slana@mail.ru>, <info@lenels.ru>, <cinema@gatchina.ru>, <petrotepholod@rambler.ru>, <eltstrom@mail.wplus.net>, <pivovarov@itel.ru>, <semenova@itel.ru>, <pitplus_avto@mail.ru>, <mail@ooo-nemo.ru>, <bklogo@mail.ru>, <info@marlingroup.biz>, <piligrim-info@yandex.ru>, <sl-nevo@yandex.ru>, <gavrilova_viktor@inbox.ru>, <plestsov222@mail.ru>, <svservise@list.ru>, <rutdevi@mail.ru>, <info@promexcut.ru>, <nelson.spb@bk.ru>, <mastergrp@ya.ru>, <tmaster_spb@mail.ru>, <montessori@line.ru>, <montessori_spb@bk.ru>, <info_spb@maritimebank.com>, <news@dp.ru>, <contact@dp.ru>, <mail@stroybalt.ru>, <tekos@lek.ru>, <juliafsm@peterstar.ru>, <gendird@krass.spb.ru>, <office@krass.spb.ru>, <info@piaterka.ru>, <parex@mail.wplus.net>, <yppcb@mail.wplus.net>, <vol_prostor@mail.ru>, <vol_prostor@mail.ru>, <rosstrah@list.ru>, <eurofingroup@mail.ru>, <info@stalkanat.com>, <secrgd@sozvezdie.biz>, <karkas.tikhvin@rambler.ru>, <director@hpc.spb.ru>, <grant-m@inbox.ru>, <st_petersburg@dakorus.com>, <venetsia@mail.ru>, <priozersk-okna@mail.ru>, <shop@ted-lapidus.spb.ru>, <fedortsov@spb.stbank.ru>, <elg@spb.lanta.ru>, <info@euroluxspb.ru>, <mpkspb@pochta.ru>, <kranavto@yandex.ru>, <mail@veresk.spb.ru>, <info.fiesta@mail.ru>, <zaovek@yandex.ru>, <secretary-loz@szma.org>, <marevo@smtp.ru>, <rsu-1@rambler.ru>, <vad_pr@rambler.ru>, <altmeb-sp@mail.ru>, <ammarilliss@mail.ru>, <alisadon@inbox.ru>, <toksraipo@yandex.ru>, <baget@QualiWood.ru>, <ert@nww.spb.ru>, <top@alphavita.ru>, <vegalux@mail.ru>, <krilak@yandex.ru>, <tehsouzspb@mail.ru>, <Info@hansacombank.ru>, <j_hedrot@front.ru>, <chief@gendevopment.ru>, <iststroy@spb.iststroy.ru>, <borguzin2007@rambler.ru>, <it@dialogit.ru>, <office@btispb.ru>, <nwg@list.ru>, <sr@chemi-bridge.com>, <lenobltorg@peterlink.ru>, <loskkredit@mail.ru>, <Specmontag-sp@rambler.ru>, <speirs@nwcc.ru>, <mrmur@mail.ru>, <info@rimusspb.com>, <ant@7156001.ru>, <info@geostroy.ru>, <angelika.fokina@geostroy.ru>, <info@nev-al.ru>, <info@westcall.spb.ru>, <sales@linfas.ru>, <mail@zariadnov.ru>, <zariadnova@yandex.ru>, <socialproject111@rambler.ru>, <dlv48@yandex.ru>, <katya_avtoprom@mail.ru>, <zao_soyuz@mail.ru>, <org@tbnrussia.org>, <accr@accr.ru>, <gabduullina@digitalads.ru>, <clovis@clovis.ru>, <infospb@innogarant.ru>, <tav@innogarant.ru>, <tdregata@rambler.ru>, <sverdlin@yandex.ru>, <customs@balt-shelf.spb.ru>, <89095896524@a2club.su>, <nleushina@yandex.ru>, <dikomserv@mail.ru>, <office@miakom.ru>, <neviss@neviss.ru>, <337-17-87@mail.ru>, <TEPSET@mail.ru>, <strholding@ya.ru>, <zda@hotmail.ru>, <karavanavto@mail.ru>, <info_spx@mail.ru>, <reception@elitacompany.ru>, <SLAVA0511@yandex.ru>, <120am@rs-baltic.ru>, <kkabanova@karoteks.ru>, <petro-holding@bk.ru>, <troshanov@yandex.ru>, <rainis.spb@mail.ru>, <sergey.sveshkov@savantinternational.com>, <mailbox@eltete-sp@yandex.ru>, <п я н я н я -kstm@mail.ru>, <ltk@tehnosintez.com.ru>, <vesta_ing@bk.ru>, <vesta-dzalba@mail.ru>, <stroymaximum@list.ru>, <zavod.bsv.pack@rambler.ru>, <amt65@yandex.ru>, <director@baltpak.ru>, <pp_julia@mail.ru>, <export@aktivista.ru>, <info@szmetal.ru>, <nurgazi@mail.ru>, <info@tic-petersburg.ru>, <piter_obl_kadr@vmkros.ru>, <taivova-holding@mail.ru>, <primer-plastmo@list.ru>, <exchange@umex.ru>, <referent@idalgovine.ru>, <sfedulin@tdaurora.ru>, <info@tdaurora.ru>, <info@rozvetrov.ru>, <lenoblvodokanal@mail.ru>, <oaogkz@mail.ru>, <zimbulit@yandex.ru>, <Export.ru@gmail.com>, <nurulin@acea.neva.ru>, <rskvartal@yandex.ru>, <bosfor-info@mail.ru>, <angel@sp.ru>, <ivt-rus@bk.ru>, <teploservis@yandex.ru>, <pge@pge.ru>, <tuchkova.ssk@mail.ru>, <info@rusprom-post.ru>, <AVIVAC@sovintel.ru>, <cleanlab@gmail.com>, <plemhoz@lens.spb.ru>, <sm@bdlm.ru>, <narendra@rohadyechem.ru>, <itc.spb@pochta.ru>, <2343276@mail.ru>, <takom_oil@bk.ru>, <taxi300-40@yandex.ru>, <chief@aurorats.ru>, <atospb@mail.ru>, <mail@aww.ru>, <priventa-

spb@yandex.ru>, <salle@szsk.ru>, <tayfun99@mail.ru>, <info@art-ent.ru>, <office@ksp.keramir.com>, <ps-balt-stroy@mail.ru>, <frast3@home.ru>, <info@elteh.ru>, <mail@centrgaz.com>, <"mail@centrgaz-nf"@mail.ru>, <zaschita@zaschita-spb.ru>, <normal@lek.ru>, <info@karter.ru>, <ks@karter.ru>, <ARB-CL@yandex.ru>, <erg@ptz.ru>, <workline@workline.ru>, <angi@mail.ru>, <office@eztab.ru>, <pr@atl.biz>, <anna.sadkova@storaenso.com>, <razin_sv63@mail.ru>, <stroy_house@mail.ru>, <lfst@mail.ru>, <travel@r-c-c.ru>, <vlad@r-c-c.ru>, <semirenkovic@gmail.com>, <fish@gtm.ru>, <tradeestate@gmail.com>, <tdbuz@mail.ru>, <usr@rambler.ru>, <atps@kspb.ru>, <rusunt@rambler.ru>, <office@stdom.ru>, <6-line@mail.ru>, <adubov@okil.ru>, <bra@prof-director.ru>, <info@academspb.ru>, <remi.spb@mail.ru>, <pm@pisem.net>, <prologue@mail.ru>, <nsazonova@ealog.ru>, <tgrigoreva@ealog.ru>, <mayak.spb@rambler.ru>, <soki@aik.spb.ru>, <lesmash@mail.ru>, <snytko@wmcime.ru>, <helixltd@yandex.ru>, <maksstroy@mail.ru>, <cherus@cherus.ru>, <of-spb@of-spb.ru>, <pr@stepcon.ru>, <sgm-office@prigroup.ru>, <svetlana.solovieva@pt-g.com>, <office@pt-g.com>, <info@piter-trust.ru>, <office@statustspb.ru>, <info@ru.gestamp.com>, <info@intercert.ru>, <gurin@vendera.ru>, <nwb100@rambler.ru>, <marcozi@mail.ru>, <invest.stroy@inbox.ru>, <tara@salef.ru>, <info@aresearch.ru>, <galina@granat-e.spb.ru>, <irina@granat-e.spb.ru>, <skorodumov@nevoplast.ru>, <info@nevoplast.ru>, <saenko@magneton.ru>, <9202324@mail.ru>, <belozarov-alex@mail.ru>, <info@euromoulding.ru>, <sergey.medvedev@lindab.ru>, <vologdin@amg.spb.ru>, <shilina@amg.spb.ru>, <gendir@rgsg.ru>, <seltmann@mail.ru>, <igor@allergodom.ru>, <solovyova@rosmoravia.ru>, <info@antcom.ru>, <sale@antcom.ru>, <izoradetal@izoradetal.ru>, <nefakt@mail.ru>, <ccc5508298@mail.ru>, <sk20009@yandex.ru>, <viktor-spi@mail.ru>, <gips-spb@mail.ru>, <sovexll@mail.ru>, <admin@ferrex.ru>, <galera@lens.spb.ru>, <elcompl@skylink.spb.ru>, <pojstoysevis@gmail.com>, <hvorostenko@spb.poddon.ru>, <ko_len@mail.ru>, <alenn2007@yandex.ru>, <aleev@lmi.ru>, <Andrej.Mishin@privatbank.ru>, <pavel.bukreev@privatbank.ru>, <ohrana@nord-palmira.ru>, <info@joco.ru>, <info@sovpym.com>, <we.mail.golikov@vek-telecom.ru>, <info@vek-telecom.ru>, <reglament05@mail.ru>, <avicos@interlink.ru>, <apen@online.ru>, <pb@bsholding.ru>, <optekom@mail.wplus.net>, <info@stprofi.ru>, <ooo-grif@mail.ru>, <v.sibina@spb.otpbank.ru>, <pavel@gradi.ru>, <nfort@bk.ru>, <info@gsmc.ru>, <vsv@medius.ru>, <office@medius.ru>, <wikusha2006@mail.ru>, <obpi_spb@sp.ru>, <dom-ex@yandex.ru>, <info@bta-spb.ru>, <lesnoy48@mail.ru>, <selezneva@m-industry.ru>, <samsonov-progress@rambler.ru>, <mail@gen-stroy-proekt.ru>, <info.cck@mail.ru>, <inateek.spb@gmail.com>, <opcenter@mail.wplus.net>, <baHit-oi@sovintel.ru>, <director@rsti.ru>, <rosstroinvest@mail.ru>, <baza@mail.wplus.net>, <glavpromstroy@sznk.ru>, <anatolie68@mail.ru>, <info@aleithe.ru>, <office@smu303.spb.ru>, <office@servis-sklad.ru>, <szags@szags.ru>, <info@ballts.ru>, <filial@mnhb.ru>, <office@ocs01.ru>, <officespb@atyashevo.ru>, <stroitehnika@peterstar.ru>, <stroitehnika@mail.ru>, <keysi@bk.ru>, <jr76@mail.ru>, <office@nwenco.ru>, <capstroy@tecom.ru>, <mam@smenapola.ru>, <info@pischevik.ru>, <INO2003@list.ru>, <2988481@mail.ru>, <sms10@mail.ru>, <office@tbs.spb.ru>, <emc@regcon.ru>, <fort.spb@fortltd.ru>, <buch_1.spb@fortltd.ru>, <manager@altdvp.spb.ru>, <info@altdvp.ru>, <vostok-alfa@mail.ru>, <info@invertor.ru>, <irina@meteors.ru>, <golovanov@modul-electro.ru>, <andreystif@mail.ru>, <rezervspb@mail.ru>, <yukontihvin@rambler.ru>, <main@sinay.ru>, <spb@pervobank.ru>, <ganeevad@pervobank.ru>, <balticst@mail.ru>, <sk-texnostroi@mail.ru>, <info@statica.ru>, <jactrading@mail.ru>, <office@ncao.ru>, <rem-jilfond@yandex.ru>, <info@profnastil.spb.ru>, <zaharov63@inbox.ru>, <mail@aviktime.ru>, <yev.ilyin@gmail.com>, <info@advant-insur.ru>, <petersburg@avantapersonnel.ru>, <nsk-energo@mail.ru>, <av@atemspb.com>, <adriana@adri.ru>, <admin@aquadiez.spb.ru>, <uplast@uplast.ru>, <ter@lopp.ru>, <carwood@vbg.ru>, <dir@slpro-spb.ru>, <sales@spb-house.ru>, <petplast@yandex.ru>, <bespalovvi@mail.ru>, <owms@owms.ru>, <info@nordica.spb.ru>, <gulkayt@yandex.ru>, <dnf@delum.ru>, <andreeva@delum.ru>, <ael@delum.ru>, <tim_anter@ztel.spb.ru>, <corian.izisk@list.ru>, <aspb1991@yandex.ru>, <info@ipm.ru>, <agroservis@mail.ru>, <teplogazservice@bk.ru>, <dir@maximatica.ru>, <gulkayt@yandex.ru>, <kirishiveza@list.ru>

<zki@altes.ru>, <company@alevas.ru>, <gulskayt@yandex.ru>, <artsokspb@westcall.net>, <kicherov@str-telecom.ru>, <samohin@str-telecom.ru>, <stroybalans@mail.ru>, <info@etalon.su>, <ss-wood@mail.ru>, <ASTZ@mail.ru>, <sicuro_dda@mail.ru>, <info@telespb.ru>, <smi_spb@bk.ru>, <office@jpsptavel.ru>, <kowalskaya@mail.ru>, <polimer2004@yandex.ru>, <kazanov@zsp.spb.ru>, <info@ss-pt.ru>, <ira@denils.spb.ru>, <mail@dvgnezd.ru>, <etris@torzhok.tver.ru>, <smu-78@bk.ru>, <vlada@ok-spb.com>, <ezarubina@spb.fitness.ru>, <Barabanov@spb.fitness.ru>, <trodriguez@spb.fitness.ru>, <info@gasavto.ru>, <gcb@gcb.spb.ru>, <mail@antaeus.ru>, <tavkos@mail.ru>, <office@spbopen.ru>, <ru-general@ru.hjnetnz.com>, <info@forum-media.ru>, <info@alvatex.ru>, <ok@baltsk.ru>, <bsk@baltsk.ru>, <stspektr@mail.ru>, <sib@tk-pik.ru>, <irakli-pik@mail.ru>, <su61-38@mail.ru>, <office@petrotravel.ru>, <denisova@baar-consulting.de>, <info@lenmontag.ru>, <amg@lenmontag.ru>, <zaharov@lenmontag.ru>, <mercury-info@mail.ru>, <valaam@valaam-info.ru>, <pr@valaam-info.ru>, <marketing@rbtour.ru>, <prof2002@yandex.ru>, <katkov@sotrans.ru>, <info@cns-spb.ru>, <logistic@transskat.ru>, <transskat@mail.ru>, <kvazarholding@inbox.ru>, <blp@blp.ru>, <variad-namazov@yandex.ru>, <assk@assk.ru>, <akp2-klining@rambler.ru>, <t.anashkina@spnogilvy.ru>, <loukankin@amber.spb.ru>, <lion-2005@yandex.ru>, <mail@power-group.ru>, <alex.k@power-group.ru>, <robyv@mail.ru>, <pgir@netstar.ru>, <dmitru.allikas@yahoo.com>, <bon@nwgazprom.ru>, <v.gorbachev@tepleregion.com>, <alfeus@alfeus.ru>, <rmz.sp@mail.ru>, <Teploset80@yandex.ru>, <improekt@mail.ru>, <office@geoprof.ru>, <ledisharm@mail.ru>, <o.nikolaev@triado.ru>, <ifa_czca@mail.ru>, <rv53@yandex.ru>, <Svetlana.simonova@fazeramica.ru>, <referent@ask-spb.com>, <city-tech@bk.ru>, <7770616@mail.ru>, <office@anw.ru>, <law@bookvoed.ru>, <metgarant@yandex.ru>, <gadziev@mail.ru>, <suk71@mail.ru>, <secretary@teleport.spb.ru>, <nt@novteh.com>, <marineka@yandex.ru>, <19411941@mail.ru>, <sk-akvilon@mail.ru>, <info@metal-disain.spb.ru>, <ocenka@nwexpert.ru>, <lipinaek@mail.ru>, <customs@arivist.com>, <mansurov@arivist.com>, <schenker.spb@schenker.ru>, <umixprom@list.ru>, <alex.frolov@mail.ru>, <dpo.spb@gmail.com>, <ikorol@cnsshipping.ru>, <igor.vivsyanyy@logwin-russia.com>, <talalaiv@mail.ru>, <info@laross-t.ru>, <komunenergo@rbcmil.ru>, <1-ksk-2007@mail.ru>, <zodchiy_09@mail.ru>, <mail@technolog.ru>, <gribova@smart-consult.ru>, <info@sportinvestbank.ru>, <visotnik74@mail.ru>, <stroy-rent@mail.ru>, <office@geopribori.ru>, <audit@acg-verdict.ru>, <m.zamotaeva@acg-verdict.ru>, <berna7@bp.com>, <energoline@list.ru>, <roxy@vitraje.spb.ru>, <office@lel.spb.ru>, <valeevaz@quadrot.ru>, <a.polukeev@gmail.com>, <Victory-magazine@mail.ru>, <rumstar76@yandex.ru>, <oooskm@yandex.ru>, <info@baltic-terminal.ru>, <germes-metall@mail.ru>, <grandspb@inbox.ru>, <amirov@gesnw.ru>, <mail@emg.spb.ru>, <igrotehnika@peterstar.ru>, <encyclop@inbox.ru>, <polina-tereza@mail.ru>, <vi2608@mail.ru>, <agofonov@rline.spb.ru>, <matinv@mail.ru>, <rikim@mail.ru>, <steliks@mail.ru>, <info@corianclub.ru>, <mail@pbc47.ru>, <sale@woodway.su>, <kommash@kommash.spb.ru>, <info@ust-luga-customs.ru>, <istwest@mail.wplus.net>, <julya.kharisova@bblaw.com>, <ges@globalexpedition.ru>, <office@splittec.ru>, <alekseev_m@pvg.ru>, <skobeleva_n@pvg.ru>, <elastic.spb@mail.ru>, <resonance@mail.fi.ru>, <office@concord-catering.ru>, <9704282@bk.ru>, <shutera@inbox.ru>, <9340429@mail.ru>, <tehprom2@mail.ru>, <rinat@maxuma.ru>, <info@na-ca.ru>, <lavrentiev@nwcontact.ru>, <zaharov@nwcontact.ru>, <denis.ignatov@terramarine.ru>, <3313832.02@mail.ru>, <ooourdim@yandex.ru>, <mail@aller-petfood.ru>, <minchenokt@aller-petfood.ru>, <mail@work-wear.ru>, <office111@cityagency.ru>, <lenspecsmu@lenspecsmu.ru>, <libertistil@mail.ru>, <npf_bulat@mail.ru>, <info@setproduction.ru>, <info@danlen.ru>, <dmitriy.bruevkin@nl.ru>, <info@peterstar.ru>, <buslo@office.peterstar.com>, <sps.spb@list.ru>, <info@active-info.ru>, <vs@active-info.ru>, <uas@eddem-cc.ru>, <smirovau@list.ru>, <info@diroswood.ru>, <prmadam@mail.ru>, <alyona@skycity.spb.ru>, <mail@nwlow.ru>, <b3351@yandex.ru>, <dolceporte@mail.ru>, <info@intalev.spb.ru>, <profil@alter-plus.ru>, <damanin@alter-plus.ru>, <office@izoltech.ru>, <varisov@impora.ru>

<info@nevet.ru>, <dir@euroteplo.ru>, <info@euroteplo.ru>, <atp_trial@mail.ru>, <ksenia@mistraltur.ru>, <kzubarev@list.ru>, <avgust1992@mail.ru>, <albion_gtn@mail.ru>, <nastya@spb.pereezd.ru>, <monitor@gatchina.ru>, <vniti@mail.ru>, <olga.balyberdina@x5.ru>, <accordtt@bk.ru>, <duplet22@mail.ru>, <obitel@gtn.ru>, <rina@hobbyauto.ru>, <spb@sngi.ru>, <office@sosng.spb.ru>, <abashina_ta@sngi.ru>, <galina@fishkey.spb.ru>, <3330994ko@mail.ru>, <info@aqualand-spbu.ru>, <gcrr@mail.ru>, <marianna7772009@yandex.ru>, <agromash@list.ru>, <salon_tet-a-tet@mail.ru>, <secretar@avk-peterburg.ru>, <diplomatschool@mail.ru>, <ethp@yandex.ru>, <lrief@gtn.ru>, <mail@gief.ru>, <npopova@tsp.spb.ru>, <reservation@hotel-spbu>, <office@vodokanal.gtn.ru>, <tzmtstars@mail.ru>, <duplet22@mail.ru>, <duplet22@mail.ru>, <duplet22@mail.ru>, <concordsp@yandex.ru>, <pgt@petergate.ru>, <zaoti@yandex.ru>, <nienshanz@yandex.ru>, <icedoka@yandex.ru>, <yvn_const@inbox.ru>, <info@art-ld.ru>, <paparosta@mail.ru>, <setis@hotmail.ru>, <buzm@mail.ru>, <albus@mail.lanck.net>, <connectors.ru@staubli.com>, <ooozkm@yandex.ru>, <izuminka_sek@mail.ru>, <ipsavoev@yandex.ru>, <info@agrocomplete.ru>, <dan@sant97.ru>, <info@vyborsec.ru>, <info@p-mix.ru>, <szactroy@mail.ru>, <a_boriskin@mail.ru>, <terminal-klub@rambler.ru>, <3477516@mail.ru>, <mail@tkaltair.ru>, <elena_enerprom@mail.ru>, <mail@oblp.ru>, <info@dinrus.com>, <energo@gtn.ru>, <olgarodnic@mail.ru>, <newnovik@yandex.ru>, <sirius@prugina.ru>, <rtkcompany@yandex.ru>, <lonb@rambler.ru>, <Muhin_A_N@mail.ru>, <pna@r78.artc-alisa.ru>, <n.panteleeva@p-o-z.ru>, <mebel@focus.spb.ru>, <formakron@mail.ru>, <office@texpolimet.ru>, <mail@cortem.ru>, <kurzner@ra-ma.ru>, <oleg@electrowork.ru>, <art-stones@bk.ru>, <xonin.g@mail.ru>, <fedorova@abistec.ru>, <mail@attorney-security.ru>, <mgb@list.ru>, <nermakova@deltatel.ru>, <pr@isgl.ru>, <uborkapro@mail.ru>, <kdolomit@yandex.ru>, <cryogas@cryogas.ru>, <ekolog-spbu@list.ru>, <dom@gatchina.ru>, <su188300@rambler.ru>, <lapinkulta@peterlink.spb.ru>, <balt_service@mail.ru>, <zao-malen@rambler.ru>, <mail@apfk.ru>, <mb@bspb.ru>, <corel@bspb.ru>, <mihail.i.gorba@bspb.ru>, <region47@bk.ru>, <irada-gardashova@yandex.ru>, <office@petito.ru>, <lukspro@yandex.ru>, <levronspbu@mail.ru>, <kim@megabox.ru>, <dir@lonopark.ru>, <ur.f.mitra@mail.ru>, <caparol@spb.caparol.ru>, <secretar@lenprodtorg.ru>, <ilrt@lenprodtorg.ru>, <andrej-shabovich@yandex.ru>, <esz_vs@mail.ru>, <ooo_gella@inbox.ru>, <pck@mail.ru>, <mnk@list.ru>, <info2007.spb@inbox.ru>, <zakaz@ima-print.ru>, <balaton@telros.net>, <stroytrestsurs@mail.ru>, <jettrace@mail.ru>, <yurkova.E@eureca-group.com>, <mega-most@list.ru>, <info@spin-floors.ru>, <anisa.fasahova@lp.ru>, <taxi16600@mail.ru>, <a.oleg.r@mail.ru>, <stroynehsevis@mail.ru>, <mail@kmk.spb.ru>, <konovalov@kmk.spb.ru>, <sambuk@botanicum-spbu.ru>, <a-s@alarm.spb.ru>, <express-pressa@mail.ru>, <secr@atomprof.spb.ru>, <elxe@bk.ru>, <gtn_strahovanie@mail.ru>, <ardis@gtn.ru>, <info@pravo-f.ru>, <guban11@mail.ru>, <v.gromov@asterialtd.ru>, <eiz@mail.ptl.ru>, <mirawear@mail.ru>, <colorado_diez@mail.ru>, <nss@bk.ru>, <port35@mail.ru>, <okp@nm.ru>, <aven_director@list.ru>, <ergazin@srsu-sverdlov.ru>, <mail@newscom.ru>, <direct@jyrlist.ru>, <otteva@yandex.ru>, <info@iso-tech.ru>, <vjr@yandex.ru>, <kov@formpro.spb.ru>, <info@spik-spbu.ru>, <foenix2@mail.ru>, <petromed@list.ru>, <pochta_adv@mail.ru>, <zaoadv@hotmail.ru>, <kb@jupiter.spb.ru>, <promstroysevis@mail.ru>, <olga@molzavod.ru>, <Maxim.lry@gmail.com>, <office@steel-trade.ru>, <3242474@ujut.ru>, <9993848@mail.ru>, <neostrom2001@yandex.ru>, <info@rollstandart.ru>, <et@rollstandart.ru>, <kd@rollstandart.ru>, <ruslan@reputin.ru>, <info@ces-spbu.ru>, <info@remis.su>, <info@markon.com.ru>, <piter@sk-rostra.ru>, <gg@staf.ru>, <lms-spbu@bk.ru>, <info@alumstroy.spbu.ru>, <prm01@yandex.ru>, <rosskarta@mail.ru>, <info@320-60-10.ru>, <stroystandart-tihvin@yandex.ru>, <stdvbg@mail.ru>, <prau-priozersk@mail.ru>, <alchemino@gmail.com>, <zaogies@mail.ru>, <albartd@inbox.ru>, <komfort@lenspecsmu.ru>, <astor@astor.ru>, <info@granos.ru>, <info@prime-route.com>, <sergey.nazarov@prime-route.com>, <centr.gaz@yandex.ru>, <za@sovintel.ru>, <olga@illuzion.tv>, <filar@list.ru>, <norvest@gtn.ru>, <medzoyan@yahoo.com>, <antarctica-vent@yandex.ru>, <osetrova2004@mail.ru>, <info@kzgroup.ru>, <ujut01@mail.ru>, <sinava2003@mail.ru>

<baltflatervis@yandex.ru>, <dan-4004@mail.ru>, <dmitrii.roza@mail.ru>, <tmt-rus@yandex.ru>, <skf@mail.linkey.ru>, <voronov@petly.ru>, <niigaz@niigaz.spb.ru>, <89013025546@mail.ru>, <info@ipcenter.ru>, <a.anatolev@ipcenter.ru>, <lebedev@metrika-market.com>, <go-sonar@mail.ru>, <const@rizalit.spb.ru>, <pantona@mail.ru>, <spb@petro-snab.ru>, <grin.autoport@mail.ru>, <info@5-th-element.ru>, <kabel@kabel-diana.ru>, <info@videotest.ru>, <elena@tronele.ru>, <info@promoils.ru>, <severst@nevamt.spb.ru>, <tiger333@mail.ru>, <op-mars@yandex.ru>, <office@npfpol.ru>, <mail@ootrial.ru>, <vvb@nevamt.spb.ru>, <glazov24@gmail.com>, <sonata@hotel-sonata.com>, <info@rusma.spb.ru>, <mdk-invest@mail.ru>, <office@persona.spb.ru>, <mupazio@mail.ru>, <info@vt-spb.ru>, <mail@ksenija.ru>, <7033643@mail.ru>, <6100436@mail.ru>, <info@viasm.ru>, <mail@viasm.ru>, <stroitel12008@yandex.ru>, <alio@aliotstroy.ru>, <ppp-otr@rambler.ru>, <roman.nazmeev@marsovopole.com>, <info@avm-zveno.ru>, <marchenkosa@spb.st-rez.ru>, <st-rez@trade.spb.ru>, <info@brokervv.ru>, <gadirov1973@mail.ru>, <greenlight_2007@mail.ru>, <anatoly@oft-media.ru>, <info@baltsib.ru>, <office@ru.pepperl-fuchs.com>, <idolgosheyeva@stalburg.ru>, <ivanova@rustest.spb.ru>, <ossktspp@rustest.spb.ru>, <gran_2006@list.ru>, <anov@ascentu.ru>, <colga-ev@yandex.ru>, <bnprod@yandex.ru>, <info@kms-consult.ru>, <info@spbetz.ru>, <gach@spbetz.ru>, <gefesd@gefesd.ru>, <iparis-11region@mail.ru>, <kononova47@mail.ru>, <fi-sher@rambler.ru>, <konkord-63@mail.ru>, <nedovodiev-alex@yandex.ru>, <a.shakin@dalva.ru>, <golubkov@inbox.ru>, <npt_agis@mail.ru>, <iordan@alitet.com>, <sosnadm@mail.ru>, <skv@baltclimat.ru>, <elk1@list.ru>, <remberg@bk.ru>, <support@ntoi.ru>, <igor@inguotes.ru>, <anatoly@inguotes.ru>, <pavel@inguotes.ru>, <mrbukht@mail.ru>, <pmgamper@rambler.ru>, <av@moneyps.ru>, <akn n spb@yandex.ru>, <energokapital@list.ru>, <belartk@rambler.ru>, <exfor@vyborg.ru>, <oseniya@gmail.ru>, <ch-arch@yandex.ru>, <komplekt-kingisepp@yandex.ru>, <stoik-90@yandex.ru>, <kdl-group@mail.ru>, <zhidkov@wmt-spb.ru>, <nadi65@yandex.ru>, <info@moozs.ru>, <ingerburg@mail.ru>, <gen_together@mail.ru>, <pravo-st@yandex.ru>, <pol-stroy@bk.ru>, <info@btrade.ru>, <130363@yandex.ru>, <elis_k@mail.ru>, <rot-front2003@mail.ru>, <mail@rot-front.com>, <krm2006.spb@gmail.com>, <compact-plus@yandex.ru>, <raidospb@bk.ru>, <sfera-king@ya.ru>, <p-energostroy@mail.ru>, <bismark.ag@mail.ru>, <azs@uimp.ru>, <valefil@mail.ru>, <valefil@narod.ru>, <starpstr@mail333.com>, <mail@academs.ru>, <bcmatrix2005@mail.ru>, <e-garant@mail.ru>, <parfenon@mail.com>, <geo@tprog.ru>, <mgzdsm@mail.ru>, <common@truvor.spb.su>, <profil@sp.ru>, <pzmgbk@mail.ru>, <ev@realweb.ru>, <sale@realweb.ru>, <sdenisov@emilianobuttons.com>, <gtnhol@gatchina.ru>, <hasky@hasky.ru>, <OOOESK@mail.ru>, <5088@5088.ru>, <german-p@mail.ru>, <0174166@mail.ru>, <travel_buro@gatchina.ru>, <klinikaDK@mail.ru>, <stcprocess@rambler.ru>, <belousova@vashetoplivo.ru>, <manager@segwayspbtour.ru>, <pavlova@prinpar.ru>, <lensvet7471@yandex.ru>, <abrateh@bk.ru>, <school6@kir.lokos.net>, <stil_dom@prudens.eu>, <acv.60@mail.ru>, <sales@hplush.ru>, <clserv@clserv.ru>, <oaometalcomp@mail.ru>, <magazin-centr@yandex.ru>, <imit@imitrussia.ru>, <spb@medved1.ru>, <gakkelhause@inbox.ru>, <mehsib@mail.ru>, <zinaida@newbt.spb.ru>, <office@newbt.spb.ru>, <gikstroy@mail.ru>, <nevvis@gmail.com>, <vlad_vil@mail.ru>, <main@soglasie.spb.ru>, <mazepa@gtm.ru>, <22762@mail.ru>, <val-63@bk.ru>, <frolov@lspg.ru>, <velena@lspg.ru>, <komdir@diva.spb.ru>, <andreevskie_m@mail.ru>, <maha.28@mail.ru>, <gold2005@rambler.ru>, <agro.udacha@mail.ru>, <sp.rsu@mail.ru>, <a-shakh@yandex.ru>, <a-shahi@yandex.ru>, <kompanytavol@gmail.com>, <rouslana.burova@gmail.com>, <naukograd-spb@mail.ru>, <office@veterspb.ru>, <konsiswww@mail.ru>, <tberdnikov@gmail.com>, <medintegra@mail.ru>, <vegaplus05@mail.ru>, <mail@karcher-service.ru>, <studynlp@gmail.com>, <partner.gtm@mail.ru>, <sivcov@ecotechspb.ru>, <info@ecotechspb.ru>, <eabeton@mail.ru>, <zavod@aerobeton.net>, <gorshkalyeva-marina@yandex.ru>, <chao@xlab.ru>, <yury.kirgisov@sandvik.com>, <info@indoor-spb.ru>, <nikolay.balashov@areva-td.com>, <vorobjevaiv@spb.ntb.ru>, <klochkov_aa@spb.ntb.ru>, <office@gerakl.org>, <press@maxidom.ru>, <marina.verkhotina@martela.ru>

<admrumi@mail.ru>, <info@rospol-electro.ru>, <office@grouporion.ru>, <mail@bsrspb.ru>, <s.petersburg@abstr.ru>, <mail@stem-stroy.ru>, <podporoghie@yandex.ru>, <vest-78@yandex.ru>, <andreyfdv@rambler.ru>, <activspb@mail.ru>, <info@center-inform.ru>, <bf@brok.ru>, <oolmr@mail.ru>, <prolong-spb@ya.ru>, <artem.kuznecov@leadercompany.ru>, <margarita.ustinova@leadercompany.ru>, <eleosmc@yandex.ru>, <ly_petrova@mail.ru>, <info@ashipyards.com>, <perfectperson@mail.ru>, <info@hzpc-sadokas.ru>, <pgf@gtm.rpb.ru>, <emj@gtm.rpb.ru>, <dmitriev@famegroup.ru>, <sugjan@mail.ru>, <sviv@sviv.net>, <info@ruscobank.ru>, <vahter1938@mail.ru>, <apg@preforma.ru>, <boysergei@yandex.ru>, <public-pro@bk.ru>, <info@voznmerud.ru>, <stroymaster.s@yandex.ru>, <neytrale@mail.ru>, <isidatravel@mail.ru>, <nika-stroi.work@rambler.ru>, <mitrich-rex@yandex.ru>, <skt.dir@mail.ru>, <rechkinbv@mail.ru>, <nmr@solu.ru>, <vtk@vbg.ru>, <info@tennis-dynamo.ru>, <sb@skyboat.ru>, <pogat@mail.ru>, <societa@mail.ru>, <zsa-1@mail.ru>, <ulrk@mail.ru>, <office@arhr.ru>, <lifremontvyborg@mail.ru>, <speizumrud@bk.ru>, <director@vscspb.ru>, <office2@vscspb.ru>, <ins@1sk.ru>, <sogaz@sogaz.ru>, <plp2000@mail.ru>, <arti-m.spb@mail.ru>, <irma-pff@mail.ru>, <ruslan-shott@yandex.ru>, <T.Voronova@kf.ru>, <aly@ofdir.ru>, <smirnov@sst.ru>, <weekend130@mail.ru>, <valaam@sortfish.ru>, <info@santel.spb.ru>, <orel-vsev@rambler.ru>, <office@hlbprime.com>, <adm-gromovo@yandex.ru>, <shans-plus@yandex.ru>, <petelnikov@setcrp.ru>, <lexadav@rambler.ru>, <telekspb@narod.ru>, <bookingvbg@yandex.ru>, <strkurort@mail.ru>, <m_archi@mail.ru>, <komkon@komkon.spb.ru>, <avtomagia@bk.ru>, <avtomagia@bk.ru>, <bravanov.m@mail.ru>, <ivanova@mzarsenal.spb.ru>, <arsenal@mzarsenal.spb.ru>, <Vasina_Z@mail.ru>, <insaid4@mail.ru>, <fin.consalt@mail.ru>, <pv@svarog-spb.ru>, <bmp@baltmp.ru>, <baltmorproekt@mail.ru>, <kus49@inbox.ru>, <ivan.kuznetsov@digia.com>, <sergey6222@mail.ru>, <info@alisa-estate.com>, <a-c-s@mail.ru>, <playwood.vc@rambler.ru>, <rubikonTV@mail.ru>, <grandsweet@mail.ru>, <frunzenskiy@mosoblbank.ru>, <a.ostroumov@kfins.ru>, <s.kovaltchuk@kfins.ru>, <cargo@kfins.ru>, <admkrasnooz@mail.ru>, <alta-vista@bk.ru>, <tarabarin-alex@yandex.ru>, <stroypolimer-spb@yandex.ru>, <sales@avego.ru>, <support@sqlup.ru>, <portaldoors2006@rambler.ru>, <massiv009@rambler.ru>, <info@hotelriviera.ru>, <mail@obtv.info>, <info@essz.ru>, <inset@mail.ru>, <mail@stroybaza.net>, <kadr9@mail.ru>, <mail@rasem.ru>, <michurin-school@mail.ru>, <lamaxi1632@mail.ru>, <sk-elit@mail.ru>, <cargo@rusnautic.ru>, <auto@sktint.com>, <megakonsal@mail.ru>, <belozpr.spb@mail.ru>, <knk_shipservice@mail.ru>, <c.k.lider@mail.ru>, <gdovraypo@ellink.ru>, <gem.spb@mail.ru>, <mail@rettek.su>, <pobedit77@mail.ru>, <office@abers.ru>, <petrovckoe@yandex.ru>, <adm.razdole@mail.ru>, <petersburg.res@marriott.com>, <upline@artlife.spb.su>, <office@nevski.ru>, <info@eco-grad.org>, <lota-spb07@rambler.ru>, <sirius_spb@inbox.ru>, <purga2009@bk.ru>, <ozornik-deti@yandex.ru>, <gcrgrtn@mail.ru>, <andrianov@sferrum.ru>, <mrboush@list.ru>, <svichar@hako.ru>, <salov@hako.ru>, <branche@inbox.ru>, <office@ascon-spb.ru>, <zinchenko@ascon.spb.ru>, <grand@grand.inc.ru>, <anna@grand.inc.ru>, <apopov@gatchina.ru>, <marketing@okna-spb.ru>, <spb@bankgorod.ru>, <mail@ankergeo.com>, <set@set-energo.ru>, <ipbalan@yandex.ru>, <ulanta1@rambler.ru>, <info@ritverc.com>, <nep@nepspb.com>, <general-gem@mail.ru>, <kkspb@bk.ru>, <office@fungo.ru>, <aetrans@mail.ru>, <cleanlaif@yandex.ru>, <info@lvs-stroy.ru>, <info@zao-enrosa.ru>, <vip@fdcontinent.ru>, <bezet@list.ru>, <repin@tencon.ru>, <octant?kir@mail.ru>, <korloff.spb@list.ru>, <Meshkov8@mail.ru>, <info@business-e.biz>, <sautkin@yandex.ru>, <info@mobimat.ru>, <rusdiesel@yandex.ru>, <rusdiesel@mail.ru>, <rub11980@mail.ru>, <sebastian@list.ru>, <optica@ametist.com>, <nikolai@t-vvk.ru>, <rbee@list.ru>, <mtn@abpconsultant.ru>, <info@a-blok.ru>, <ventec2004@yandex.ru>, <AMK-PITER@yandex.ru>, <kovex@rambler.ru>, <translain@list.ru>, <pirogov-dvorik@mail.ru>, <asyak2@mail.ru>, <radm@gtm.ru>, <spb@sgasko.ru>, <agoconsult@bk.ru>, <info@spars.spb.ru>, <ooo-servis@peterlink.ru>, <center@cons.spb.ru>, <secretary@morkov.su>, <ruussia.reception@jotun.com>, <office@sedspsb.ru>, <aleksandr.shmakov@sedspsb.ru>, <klimatco@yandex.ru>, <ecolog@eneco.su>, <k.britanov@petroplastgroup.ru>, <abiplus@yandex.ru>, <ps-minvoda@yandex.ru>

Дата:

12 Apr 2010 12:10:29

Тема:

SPAM ЛОТПП Проект «2010: год чистых озер»

[win](#) [koi](#) [mac](#) [utf](#)

Английский

Русский

[Перевести](#)

Проект «2010: год чистых озер»

В рамках консолидирующего общественного проекта «Здоровье нации в здоровой экологии»

Идея проекта «Чистые озера» зародилась в 2009 году, когда одна петербургская компания взяла на себя ответственность за содержание в чистоте Голубых озер в Выборгском районе. В течение всего сезона на территории озер при поддержке местных властей проводилась уборка, которой привлекались сотрудники компании и волонтеры общественных экологических организаций. За лето состояние Голубых озер и прибрежной зоны существенно улучшились. И, что важно, была отработана эффективная модель уборки территории. Акция привлекла внимание СМИ и вызвала высокий интерес общественности.

Таким образом, появился проект **«2010: год чистых озер»**, в рамках которого представители бизнес сообщества региона могут взять под патронаж озера Ленинградской области и следить за их состоянием, используя уже отработанные методы и технологии уборки.

Проект реализуется при поддержке Правительства Ленинградской области, в нем участвуют СМИ и общественные организации.

29 апреля в Ленинградской областной торгово-промышленной палате состоится **«Аукцион озер»**, во время которого компании-участники смогут выбрать «подшефное» озеро. Это озеро будет закреплено за компанией на сезон 2010. Аукцион будет освещаться телеканалами и другими СМИ города и области.

Как показал опыт 2009 года, затраты на уборку прибрежной территории озера на сезон составляют 140 000 -160 000 рублей. Остальные средства сформируют фонд, который направляется на исполнение предложенного календарного плана, поддерживающие акции, социальную рекламу, стимулирующие мероприятия.

В мае победители аукциона озер начинают экологическую деятельность по их уборке. С мая по октябрь 2010 года силами сотрудников компании-шефа или волонтеров будет проводиться уборка прибрежной зоны озера, вестись разъяснительная работа с туристами и отдыхающими. На территории озера устанавливается стенд с информацией о компании, участники получают спецодежду и пакеты с логотипом компании, обеспечиваются необходимым инвентарем.

Управление осуществляется группой организаторов, работающих над проектом на постоянной основе. Всего за сезон (с мая по сентябрь) рекомендуется выполнить от 4 до 6 уборок (в зависимости от рекреационной нагрузки озер). Инвентарь, логистика, организация питания, вывоз мусора – компетенция организаторов.

В течение проекта будут проведены различные акции, мероприятия, конкурсы, с которыми можно ознакомиться в календаре мероприятий.

Годовая реализация проекта «2010: год чистых озер» завершится масштабным мероприятием, на

котором будут публично подведены итоги и состоится передача озер на попечение властей.
Компании-участники получают отличительные знаки на «Зеленой ленте».

Организаторы и участники проекта:

«Швейцарский клуб»:

Сопредседатель Ханс Петер Михель (мэр города Давос, Швейцария)

Сопредседатель Тамаз Мчедлидзе (президент медицинской группы МЕДИ, президент Медицинской палаты Санкт-Петербурга),

Ленинградская областная торгово-промышленная палата, Союз промышленников и предпринимателей Санкт-Петербурга.

Правительство Ленинградской области и Санкт-Петербурга, профильные комитеты, администрации районов, депутаты.

Экологические организации: «Зеленая волна» «Старк», «Движение против захвата озер» и др. СМИ:

100ТВ, РТР, «Коммерсант» «Санкт-Петербургские Ведомости», «Аргументы и факты», «Вечерний Петербург», «Территория бизнеса», «Петербургский дневник», «Выборгские ведомости».

Информационный партнер проекта – газета «Деловой Петербург».

Начало аукциона: 14.00

Место проведения: Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., д. 22,
лит. А, бизнес- центр «СОВЕРЕН», 3 этаж, конференц-зал ЛОТПП

Справки:

334-34-45– пресс-секретарь ЛОТПП Алена Некрасова

Прикрепленные файлы: 2 [Скачать одним архивом](#) (attachments12-04-2010_12-10-29.zip)

[проект.doc](#)

88 Кб [Скачать](#) [Удалить](#)

[Пакет услуг участнику проекта.doc](#)

101 Кб [Скачать](#) [Удалить](#)
