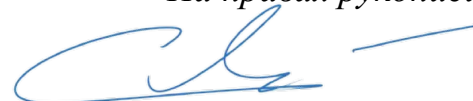


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И. И. МЕЧНИКОВА»

На правах рукописи



Лазарев Сергей Александрович

**Исследование биологической активности метаболитов пробиотических
штаммов *Bacillus***

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Михайлова Наталья Александровна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Микробиом человека и дисбиотические нарушения.....	13
1.2. Направленная коррекция дисбиоза	22
1.3. Бактерии рода <i>Vacillus</i> – продуценты биологически активных веществ, перспективных для создания новых пробиотических препаратов	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Объекты исследования	40
2.1.1. Штаммы микроорганизмов	40
2.1.2. Питательные среды	40
2.1.3. Экспериментальные животные.....	42
2.1.4. Коммерческие препараты.....	42
2.2. Методы исследования.....	43
2.2.1. Культивирование микроорганизмов	43
2.2.2. Изучение динамики роста исследуемых штаммов	43
2.2.3. Получение метаболитов	44
2.2.4. Методы изучения противомикробной активности	44
2.2.5. Методы определения ферментативной активности	45
2.2.6. Метод определения биопленкообразования микроорганизмов	46
2.2.7. Фракционирование метаболитов.....	47
2.2.8. Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэммли.....	47
2.2.9. Метод проточной цитометрии	48
2.2.10. Метод хромато-масс-спектрального анализа	49
2.2.11. Изучение безвредности метаболитов.....	50
2.2.12. Методика формирования экспериментального дисбиоза и его коррекции	50
2.2.13. Методика количественного и качественного исследования мукозной микробиоты толстого кишечника.....	51

2.2.14. Идентификация выделенных микроорганизмов.....	52
2.2.15. Статистическая обработка данных.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
3.1. Определение оптимального состава питательной среды и времени культивирования для штаммов <i>Bacillus subtilis</i>	54
3.1.1. Подбор оптимального состава питательной среды	54
3.1.2. Определение оптимального времени культивирования	63
3.2. Исследование биологической активности метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> в опытах <i>in vitro</i>	68
3.2.1. Исследование антимикробной активности фракций метаболитов	68
3.2.2. Исследования состава низкомолекулярной фракции метаболитов	71
3.2.3. Исследование ферментативной активности метаболитов	74
3.2.4. Изучение влияния метаболитов на биопленкообразование условно- патогенных бактерий	75
3.2.5. Определение цитокиноподобных веществ в составе метаболитов.....	78
3.2.6. Определение условий сохранения биологической активности метаболитов.	81
3.3. Исследование безвредности и биологической активности метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> в опытах <i>in vivo</i>	84
3.3.1. Изучение безвредности метаболитов.....	84
3.3.2. Моделирование дисбиоза у мышей и его коррекция	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На современном этапе развития науки использование молекулярно-генетических, микробиологических, иммунологических методов исследования позволило значительно углубить понимание роли симбиотических микроорганизмов в жизнедеятельности человека [1, 118, 132, 170, 204, 205].

Основные функции индигенной микробиоты включают обеспечение колонизационной резистентности организма, участие в нейтрализации и деградации токсических веществ и факторов агрессии, регуляцию метаболических ферментативных процессов, а также ключевую роль в формировании и поддержании иммунного гомеостаза [4, 13, 45, 65, 158].

Качественные и количественные изменения микробного состава биотопов организма, известные как дисбиоз, рассматриваются как значимый фактор, предрасполагающий к развитию широкого спектра патологических состояний. К ним относятся заболевания желудочно-кишечного тракта, метаболический синдром, оппортунистические инфекции, аутоиммунные и аллергические заболевания, и прочие [96, 103, 115, 145, 160, 164, 206, 215].

Для коррекции дисбиоза применяются различные пробиотики – препараты, содержащие живые микроорганизмы. Такой подход имеет ряд недостатков: выживаемость в организме низкая, эффективность непредсказуема, действие часто временное и существует риск побочных эффектов. Перспективным направлением является разработка препаратов на основе метаболитов микробного происхождения, не содержащих живых микроорганизмов и получивших название метабиотики [33, 158, 176, 179]. В отличие от традиционных пробиотиков, их использование является более эффективным и безопасным [43, 44, 158]. Так как на фармацевтическом рынке Российской Федерации подобных препаратов пока недостаточно, разработка и внедрение в медицинскую практику новых

высокоэффективных препаратов-метабиотиков отечественного производства представляет собой актуальную задачу.

В настоящее время охарактеризовано большое количество пробиотических микроорганизмов с различным спектром действия, которые могут стать перспективными продуцентами для создания новых метабиотиков направленного действия.

Бактерии *Bacillus subtilis* являются мощными продуцентами биологически активных соединений и оказывают положительное воздействие на индигенную микробиоту, а также обладают иммуностимулирующим эффектом в отношении организма хозяина. Штаммы *B. subtilis* обладают высокой степенью разнообразия, продуцируя более 60 различных противомикробных метаболитов с активностью против широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Кроме того, они способны синтезировать ферменты различных классов, аминокислоты и другие биологически значимые вещества, играющие важную роль в поддержании гомеостаза макроорганизма [25, 40, 89, 102, 104, 148, 195].

Известны штаммы *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719, обладающие широким спектром антагонистической активности [48, 51]. Исследование биологических свойств метаболитов, продуцируемых этими бактериями, представляет интерес с точки зрения оценки их потенциала для дальнейшего практического применения в медицине и биотехнологии.

Степень разработанности темы исследования

B. subtilis является одним из наиболее изученных и известных пробиотических видов бактерий рода *Bacillus*. Благодаря своей безвредности для человека и высокому биологическому потенциалу, данные микроорганизмы находят широкое применение в медицине в качестве пробиотических препаратов. Терапевтический эффект *B. subtilis* обусловлен продукцией различных биологически активных веществ, что делает их перспективным объектом для разработки новых лекарственных средств [25, 40, 89, 102, 104, 148, 195].

В настоящее время в клинической практике применяется единственный отечественный метабиотик на основе метаболитов *B. subtilis* ВКПМ №В-2335(3)3 [50]. Однако его биологическая активность ограничивается свойствами одного штамма-продуцента. Учитывая, что спектр веществ, продуцируемых бактериями *B. subtilis*, является штаммоспецифичным, изучение биологических свойств метаболитов других штаммов позволит расширить номенклатуру лекарственных препаратов для эффективной коррекции дисбиотических нарушений.

Ранее в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова выделены и охарактеризованы пробиотические штаммы *B. subtilis* (ЗН и 1719). Установлено, что *B. subtilis* ЗН подавляет рост бактерий *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и дрожжевых грибов. Штамм применялся в клинической практике в основе пробиотика «Бактиспорин» при дисбиозах, ферментной недостаточности органов пищеварения, гнойных инфекциях, пищевой аллергии, для лечения и профилактики хирургической инфекции мягких тканей при травмах и оперативных вмешательствах [48, 64]. *B. subtilis* 1719 обладает протеолитическими, амилолитическими и липолитическими свойствами; проявляет иммуномодулирующую активность в отношении макроорганизма; антагонистически активен в отношении бактерий *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp. и грибов рода *Candida* [19, 20, 51].

Характеристика штаммов *B. subtilis* ЗН и 1719 указывает на их высокий пробиотический потенциал. Тем не менее, биологическая активность метаболитов, продуцируемых этими штаммами, остается неизученной.

Цель и задачи исследования

Цель работы – получить метаболиты пробиотических штаммов *B. subtilis* (ЗН и 1719) и исследовать их биологическую активность в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Оптимизировать процесс культивирования штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719 для получения противомикробных метаболитов с высокой биологической активностью.
2. Исследовать основные пробиотические свойства полученных метаболитов в опытах *in vitro*.
3. Определить условия сохранения биологической активности метаболитов.
4. Оценить безвредность метаболитов и их пробиотическое действие на модели экспериментального дисбиоза в опытах *in vivo*.

Научная новизна

Впервые установлено, что метаболиты *B. subtilis* (3Н и 1719) содержат противомикробные низкомолекулярные соединения (<5 кДа), активность которых определяется условиями культивирования.

Впервые продемонстрировано ингибирующее действие метаболитов данных штаммов на процесс формирования биопленок условно-патогенными бактериями.

Впервые в составе метаболитов *B. subtilis* выявлены вещества, подобные цитокинам IL-1 β , IL-8, IL-1 β , IL-31 у метаболитов штамма 3Н; IL-1 α , IL-31, IL-13 и IL-33 у метаболитов штамма 1719.

На модели экспериментального дисбиоза впервые установлены специфические особенности пробиотического действия метаболитов штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719), выражающиеся в восстановлении популяции бактерий рода *Lactobacillus* и избирательной элиминации условно-патогенных микроорганизмов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о биологической активности метаболитов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 вносят вклад в понимание механизмов действия споровых

пробиотиков и подтверждают эффективность споровых метабиотиков. Обосновано проведение дальнейших исследований, направленных на изучение химического состава метаболитов исследуемых культур, а также способов их выделения и очистки.

В процессе коррекции лекарственного дисбиоза у экспериментальных животных, получавших метаболиты штаммов *B. subtilis*, установлены различия в степени и характере восстановления микробиоценоза, которые обусловлены штаммоспецифическими характеристиками биологической активности используемых метабиотиков. Исходя из полученных результатов, метаболиты штаммов *B. subtilis* ЗН и *B. subtilis* 1719 могут быть рекомендованы в качестве основ лекарственных средств для избирательной коррекции дисбиоза, а также в качестве компонентов комплексных пробиотических препаратов, обладающих широким спектром действия.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», г. Москва, с использованием научного оборудования центра коллективного пользования. Все исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (протокол Учреждения № 6 от 13.07.2022).

Методология исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Объектами исследования стали метаболиты, полученные в результате глубинного периодического культивирования пробиотических штаммов *B. subtilis* ЗН и *B. subtilis* 1719. Предметом исследования являлись пробиотические свойства полученных метаболитов. Анализ научной литературы, посвященной теме, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов. В работе

использованы микробиологические, биохимические, физико-химические, биологические, статистические методы. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволили обеспечить объективность полученных результатов и выводов.

Личный вклад автора

Все научные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично и отражают завершённое самостоятельное научное исследование. Автору принадлежит ведущая роль в разработке дизайна исследования, проведении научно-информационного поиска по теме, формулировке цели и задач исследования, выполнении экспериментов, статистической обработке данных и обосновании ключевых положений диссертации. Подготовка основных публикаций проведена непосредственно автором.

Хромато-масс-спектральный анализ состава метаболитов проведен в лаборатории биомедицинской химии ФИЦ Биотехнологии РАН под руководством д.ф.н. Макарова В.А.

Положения, выносимые на защиту

1. Штаммы *B. subtilis* 3Н и 1719 в процессе культивирования секретируют противомикробные метаболиты с цитотоксическим действием, активность которого определяется составом питательной среды и продолжительностью инкубации.
2. Исследуемые метаболиты обладают способностью ингибировать процесс биопленкообразования условно-патогенных бактерий, содержат низкомолекулярные противомикробные соединения, протеолитические и амилолитические ферменты, цитокиноподобные вещества. Биологическая активность метаболитов остается неизменной на протяжении 12 месяцев после проведения лиофильной сушки.

3. Исследуемые метаболиты безвредны и обладают пробиотическим действием, проявляющимся качественным и количественным восстановлением микробиоценоза при лекарственном экспериментальном дисбиозе.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология, областям исследования по п. 6. «Продукция биологически активных веществ микроорганизмами», п. 7. «Ферменты микроорганизмов», п. 13. «Симбиотические микробные сообщества, в том числе микробиота человека и животных», п. 15. «Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждена проведением достаточного объёма исследований и выбором чётких, аргументированных критериев включения репрезентативного материала в исследование. В работе использовались актуальные методики, выполненные на современном сертифицированном оборудовании.

Основные результаты доложены и обсуждены на научной конференции молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology», в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета (Москва, 2020); международном форуме «Биотехнология: Состояние и перспективы Развития» (Москва, 2020); VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: Наука и Практика» (Ялта, 2020); научной конференции молодых ученых с международным участием «New approaches in the field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology», посвященной 300-летию РАН (диплом II степени на конкурсе молодых ученых) (Москва, 2023); XI международной научно-практической конференции «Биотехнология: Наука и Практика» (Туапсе, 2023).

Апробация материалов диссертационного исследования проведена на конференции отдела микробиологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Протокол №4 от 23.05.2024 г.).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре биотехнологии и промышленной фармации ИТХТ им. М.В. Ломоносова, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» в виде информации, используемой в лекционных курсах: «Биопрепараты: получение, выделение, очистка» и «Фармацевтическая Биотехнология». Акт внедрения от 14.05.2024.

Полученные результаты внедрены в компании ООО «НПЦ» (Россия, Санкт-Петербург) для изготовления пробиотического продукта симбиотического типа. Акт внедрения № 15 от 15.04.2024.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, входящих в международные базы данных, 1 из которых обзорная; 1 статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России; 1 иная публикация; 6 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 133 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 21 таблицами, 6 рисунками. Диссертация состоит из введения,

обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Список литературы включает 215 источника: 67 отечественных и 148 иностранных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микробиом человека и дисбиотические нарушения

Началом истории изучения микробиоты человека в научной сфере можно считать 1676 год. Антони ван Левенгук, помимо открытия микроорганизмов, первым выдвинул гипотезу о совместном существовании различных видов бактерий в желудочно-кишечном тракте человека. В 1850 году один из основоположников микробиологии и иммунологии Луи Пастер (1822-1895) сформулировал концепцию о функциональной роли бактерий в процессе пищеварения. А в конце XIX века, выступая на заседании Парижской академии медицинских наук, выдвинул предположение, что между болезнями и различными микроорганизмами, обитающими в организме человека, существует тесная связь [67]. В 1881 году выдающийся немецкий микробиолог, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1905 г. Роберт Кох (1843-1910) опубликовал работу, в которой описывал методы выращивания микроорганизмов на твердых питательных средах. Эти методики имели большое значение для идентификации и изучения чистых бактериальных культур, в том числе выделенных из желудочно-кишечного тракта, что необходимо для дифференциации патогенных и полезных микроорганизмов. Вскоре после этого между Робертом Кохом и Луи Пастером разгорелась острая дискуссия, но именно трудами этих ученых был заложен научный фундамент становления и развития микрoэкологии [39].

Значительный вклад в изучение симбиотических взаимоотношений человека и микробиоты внес русский микробиолог, один из основоположников эволюционной эмбриологии, создатель сравнительной патологии воспаления, фагоцитарной теории иммунитета, основоположник научной геронтологии, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине Илья Ильич Мечников (1845–1916). Ученый выдвинул положение о том, что многочисленные ассоциации микроорганизмов, населяющих желудочно-кишечный тракт человека, в значительной мере определяют его духовное и физическое состояние, а кожа и

слизистые оболочки покрыты биопленкой, состоящей из сотен видов микроорганизмов. Он также сформулировал гипотезу о необходимости борьбы с гнилостными микробами кишечника путем изменения состава микробиоты при помощи молочнокислых бактерий [54]. Свой взгляд на взаимоотношения человека и его микробиоты И. И. Мечников изложил в монографии «Этюды о природе человека» [34]. Прямым следствием его работ об антагонистических свойствах молочнокислых бактерий стали учение об антибиотиках и концепция о роли микробного антагонизма в развитии микробных биоценозов.

В 20-40-е годы XX века группой немецких ученых, а именно Артуром Беккером, Хансом Кольбом, Хансом-Петером Рушом, была сформулирована концепция о том, что слизистые оболочки различных анатомических образований организма человека представляют собой часть иммунной системы, которую предложили называть «единый слизистый орган». Эти предположения получили достаточное экспериментальное подтверждение в последующем, и сегодня уже хорошо известна аббревиатура MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) и сокращенные обозначения компонентов этой системы: SALT (skin-associated lymphoid tissue), GALT (gut-associated lymphoid tissue), BALT (bronchus-associated lymphoid tissue), NALT (nose-associated lymphoid tissue), LALT (larynx-associated lymphoid tissue), CALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue) [46].

В настоящее время благодаря современным методам молекулярно-генетических, микробиологических, иммунологических исследований достоверно доказана роль микроорганизмов в жизнедеятельности человека. Достигнут значительный прогресс в понимании микробиоты как экосистемы, выполняющей функции отдельного органа [1]. В 2001 году американский генетик и биохимик, лауреат Нобелевской премии Джошуа Ледерберг (1925-2008) определил термин микробиом как микробное сообщество, проживающее на единой территории в организме человека, и обеспечивающее хозяина (человека) различными дополнительными генетическими и метаболическими факторами отсутствующими у него [118].

По данным литературы, человеческий организм состоит примерно из 40 триллионов клеток с 23 тысячами генов, в то время как микробиота, присутствующая во всем организме и на его поверхности, оценивается в 100 триллионов (10^{14}) клеток примерно с 9 миллионами генов [132, 170, 203]. Суммарная масса микробов, обитающие в желудочно-кишечном тракте здорового человека, достигает 2,5 – 3,0 кг, тогда как масса головного мозга у взрослого человека составляет около 1,5 кг [1, 212]. Эта общая популяция микроорганизмов подвергалась тщательному анализу с 2007 года в рамках десятилетнего проекта «Микробиом человека» (The Human Microbiome project (HMP), США) с использованием современных методов отбора образцов в различных местах тела, очистки ДНК/РНК, передовых вычислительных технологий со специализированным программным обеспечением для быстрого секвенирования ДНК, а также анализ последовательности гена 16S рРНК, со статистическими достижениями, позволившими интегрировать несколько наборов данных о микробиоте, колонизирующей кожу, ротовую полость, желудочно-кишечный тракт, влагалище и другие части тела [69, 135, 140]. Проект «Микробиом человека» включал в себя две фазы – HMP 1 и HMP 2. Первый был сосредоточен на характеристике микробных сообществ различных участков организма в базовом исследовании здоровых взрослых субъектов и включал ряд демонстрационных проектов, посвященных конкретным заболеваниям или расстройствам [68, 139, 177, 200, 202, 211]. HMP2 расширил репертуар биологических свойств, проанализированных как для макроорганизма, так и для микробиоты в трех продольных когортных исследованиях репрезентативных состояний, связанных с микробиомом: воспалительные заболевания кишечника (кишечный микробиом), беременность и преждевременные роды (вагинальный микробиом). Данные исследования отслеживали их динамику с помощью мультиомного анализа нескольких типов измерений с течением времени, включая изменения в составе микробного сообщества, виромику, метаболомные профили, экспрессию генов как у хозяина, так и у микробиоты, а также специфические для макроорганизма свойства, такие как профили антител и цитокинов [155, 168, 205, 208]. Все

мультиомные данные, клиническая информация и инструменты как из HMP1, так и из HMP2 размещены в Координационном центре данных HMP (DCC), которые служат основным ресурсом для исследовательского сообщества [205]. Большое китайское исследование сахарного диабета 2-го типа вскоре предоставило дополнительные 145 метагеномов кишечника, примерно половина из которых была получена от контрольной группы, не страдающей диабетом [70]. Также в рамках Европейского проекта «Метагеномы кишечного тракта человека» (Metagenomics of human intestinal tract - MetaHIT) в 2010 году сообщалось об исследованиях микробиоты кишечника группы из 124 взрослых европейцев (преимущественно здоровых) [69]. С тех пор консорциум MetaHIT продолжает публиковать новые метагеномы [73, 141, 189]. Такие крупномасштабные исследования показали, что микробиота человека с позиции биологии имеет тесную симбиотическую взаимосвязь с организмом хозяина, в том числе на геномном уровне, с учетом общих, коллективных генов (метагеном).

Состав микробиоты уникален для каждого человека независимо от среды обитания, образа жизни, питания и приема лекарственных препаратов [125]. И варьируется у одного и того же индивидуума на фоне возрастных изменений [42]. Однако, развитие технологии секвенирования геномов и подходов, основанных на биоинформатике, позволило внести некоторую ясность в особенности состава микробиоты разных биотопов организма, а также определить некоторые ее различия в норме и при патологии. Микробиом человека представлен шестью основными группами бактерий: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, соотношение между которыми перестраивается в зависимости от биотопов организма. Например, актинобактерии преобладают в структуре микробного сообщества кожных и волосяных покровов, а также верхних дыхательных путей. Напротив, микробиота желудочно-кишечного тракта преимущественно состоит из представителей фермикутов [12, 88, 170].

Принято считать, что микробиом человека начинает активно формироваться сразу после рождения и продолжает в течение всего периода младенчества [37, 80]. Тем не менее имеются данные о возможности образования микробиоценоза в

пренатальном возрасте, о чем свидетельствовало обнаружение бактериальной ДНК в меконии здоровых новорожденных [37, 165].

В ряде исследований было продемонстрировано влияние факторов окружающей среды, таких как способ родоразрешения и характер вскармливания, на качественный и количественный состав биотопов детей. В отличие от младенцев, рожденных кесаревым сечением, при естественных родах колонизация биотопов осуществляется за счет вагинальной и кишечной микробиоты матери. В грудном молоке, наряду с питательными веществами, содержатся индигенные микроорганизмы (бифидобактерии и лактобациллы), а также около 400 разновидностей непатогенных бактерий рода *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и другие [32, 35]. Дети, рожденные от здоровой матери естественным путем и находящиеся на грудном вскармливании, имеют наиболее благоприятный микробиом, который важен для формирования оптимального гомеостаза и иммунного ответа. При заселении биотопов между микроорганизмами складываются определенные взаимоотношения, которые влияют на качественную и количественную характеристику того или иного микробного пейзажа [38].

В Российской Федерации большой вклад в изучение симбиотических взаимоотношений человека и микробиоты был сделан профессором Бухариным О. В., предложившим термин «Ассоциативный симбиоз». Это многокомпонентная интегральная система, включающая хозяина (макропартнера), стабильные доминантные (нормобиота) и минорные ассоциированные (патогенные и условно патогенные) микросимбионты с разнонаправленными воздействиями, определяющими формирование, стабильность существования и продуктивность симбиоза в целом. Ассоциативный симбиоз включает в себя три вектора этой модели – «хозяин-доминант», «хозяин-ассоциант» и микросимбиоценоз [4, 13]. Для каждого биотопа организма человека существует свой основной (доминантный) состав нормобиоты, обладающий универсальным набором характеристик микробного антагонизма. Взаимоотношения хозяина и таких микроорганизмов определяют колонизационную резистентность симбиоза, представляющую

физиологическую регуляторную систему, контролирующую проникновение эндогенных и экзогенных патогенов, оказывающую иммуномодулирующее действие в отношении макропартнера [65]. Для кишечной индигенной микробиоты важны бифидобактерии, лактобациллы, типичные эшерихии; для женского репродуктивного тракта – лактобациллы; для полости носа – стафилококки и коринеформные бактерии; для зева стрептококки и так далее [12].

Качественные и количественные нарушения микробного состава биотопов организма принято называть дисбиозом. Этот термин впервые был введен в 1916 году немецким ученым и армейским врачом Альфредом Ниссле (1874–1965), который занимался изучением антагонистического взаимодействия бактерий. Он выделил из фекальных масс солдата, единственного не заболевшего во время вспышки шигеллеза, непатогенный штамм кишечной палочки. Впоследствии Альфред Ниссле установил, что колибактерии могут ингибировать не только чужеродные патогенные виды бактерий, но и патогенные штаммы своего же вида [173]. Современные представления о дисбиозе кишечника сформулировал советский микробиолог, профессор Леопольд Генрихович Перетц (1891—1961). Данное состояние он рассматривал как изменение состава и количественных соотношений микробов, в норме заселяющих желудочно-кишечный тракт (уменьшение общего количества, изменение соотношений и ферментативных, биохимических свойств), которое сопровождается ослаблением их антагонистической активности [39].

Дисбиоз является предрасполагающим состоянием для развития широкого спектра заболеваний. Он проявляется заменой биопленок индигенной микробиоты организма хозяина на биопленки, состоящие из ассоциаций различных условно-патогенных микроорганизмов. Следствием такой трансформации является формирование локального инфекционного процесса эндогенного или экзогенного происхождения, осложнением которого может быть переход в генерализованную форму путем трансмембранной транслокации микроорганизмов и их токсинов из биотопа в кровеносное или лимфатическое русло с возникновением дополнительных очагов инфекционного процесса различной локации [60].

Нарушения микроэкологии человека является отличительной чертой абсолютного большинства заболеваний кишечника, таких как воспалительные заболевания кишечника (язвенный колит и болезнь Крона), синдром раздраженного кишечника, целиакия, колоректальный рак, кишечные инфекции (*Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* и др.) [75, 103, 120, 145, 167, 191, 215]. Дисбиоз может спровоцировать развитие болезни в первые недели жизни, как это наблюдается при некротическом энтероколите [120, 171], во взрослом возрасте при колоректальном раке [193] или у пожилых людей при диарее, ассоциированной с *Clostridium difficile* [196].

Дисбиотические нарушения является дополнительным фактором в патофизиологии сахарного диабета 2-го типа, ожирения и атеросклероза, составляющими основу метаболического синдрома [11, 83, 124, 188, 210]. В экспериментах на грызунах продемонстрирован вклад кишечных микробов в формировании данных состояний, путем трансплантации кишечной микробиоты от больного животного к здоровому [116].

В последнее десятилетие в научной литературе возросло количество публикаций, посвященных влиянию дисбиоза на развитие аутоиммунных и аллергических заболеваний, таких как сахарный диабет 1-го типа, ревматоидный артрит, тиреоидит Хашимото, рассеянный склероз, системная красная волчанка, аутоиммунный гепатит, болезнь Бехчета, бронхиальная астма и др [95, 96, 144, 160, 164, 206].

Нарушение метаболизма холина и повышенная бактериальная продукция этанола при дисбиозе кишечника играет важную роль в развитии неалкогольной жировой болезни печени [61]. Выраженный дисбаланс микробиоты толстого кишечника выявлены при циррозе печени, хроническом гепатите В, а также у пациентов с желчнокаменной болезнью (холестериновыми желчными камнями) [154, 143, 163].

Дефицит оксалат-деградирующих бактерий, таких как *Oxalobacter formigenes* и некоторых видов бифидобактерий и лактобацилл, может стать одной из причин оксалоза и привести к формированию почечных камней [72, 119].

Влияние микробиоты на неврологические расстройства выявлено на примере расстройств аутистического спектра. У многих детей и взрослых, страдающих аутизмом, возникают выраженные желудочно-кишечные симптомы, такие как запор, диарея или их чередование, которые коррелируют с тяжестью заболевания нервной системы [162, 123]. В анамнезе этих пациентов, часто встречается усиленное лечение антибиотиками в течение первых трех лет жизни [172]. Результаты ряда исследований подтверждают, что у большинства детей с расстройствами аутистического спектра изменен профиль кишечных бактерий по сравнению с нейротипичными детьми [114, 115].

В ряде современных работ показана роль микробиоты кожных покровов в патогенезе различных дерматовенерологических заболеваний, таких как акне, себорейный и атопический дерматит, розацеа, псориаз, экзема и др [3, 180, 185, 207]. Также, исследована взаимосвязь дисбиоза слизистой оболочки ротовой полости с развитием кариеса и периодонтита [138, 201, 213].

Группой китайских ученых при исследовании маркеров прогрессирования коронавирусной инфекции (COVID-19) установлено, что микроэкологический дисбаланс может потенциально предрасполагать здоровых людей к аномальному воспалительному статусу, который имеет важное значение в развитии тяжелой формы заболевания [128].

Научная литература постоянно дополняется данными о значении дисбиотических нарушений в патогенезе тех или иных инфекционных и неинфекционных заболеваний, что еще раз подчеркивает масштаб проблемы.

Причинами дисбиотических нарушений могут быть воздействия на организм различных факторов экзогенного и эндогенного характера: питания, образа жизни, возраста, окружающей среды, прием лекарственных препаратов, инфекционных заболеваний, и прочее. Часто одного из них недостаточно для развития дисбиоза, поскольку микробиота обладает внутренней устойчивостью, способностью адаптироваться в стрессовых ситуациях. Комбинированное действие нескольких факторов, напротив, может привести микробные сообщества к огромным сдвигам патологического значения [214].

Несбалансированное питание является одним из основных факторов, влияющих на микробиоту кишечника. Отсутствие питательных веществ увеличивает уровень протеобактерий, которые способствуют воспалению стенки слизистой оболочки и в конечном итоге вызывают разрушение эпителиального барьера [97]. Избыточное поступление питательных веществ приводит к ожирению, что связано с воспалительными нарушениями обмена веществ. Формирования чрезмерных жировых отложений характеризуется снижением микробного разнообразия и преобладанием бактерий типа *Firmicutes*, что наблюдается как у мышей [175], так и у людей с лишним весом [93]. Снижение количества бактероидов на фоне роста фирмикутов приводит к более высокому высвобождению эндотоксина (ЛПС) в кровотока, что способствует состоянию хронического вялотекущего воспаления, возникающего при ожирении [127]. В экспериментах на грызунах было продемонстрировано, что повышенный уровень ЛПС инициирует увеличение веса и активирует маркеры воспаления в той же степени, как и при высококалорийной диете [159].

Негативные особенности образа жизни, такие как стресс, резкие изменения климатических условий, продолжительная усталость, несоблюдение норм гигиены и прочие, являются дополнительным триггером для развития дисбиотических нарушений [41].

Количественные и качественные изменения микробиоты, сопряженные с возрастом, являются результатом естественного изменения гормональных показателей (пубертатный период, беременность, старение и т.д.) с активацией условно-патогенной флоры [42].

Окислительный стресс, возникающий во время воспаления, является фактором, усиливающим дисбиоз, способствуя росту специфических таксонов микроорганизмов. Лейкоцитарная инфильтрация является отличительной чертой воспаления, которая сопровождается образованием активных форм кислорода и азота. Возникающий в результате окислительный стресс оказывает выраженное противомикробное действие в отношении строго анаэробных бактерий, чувствительных к кислородной интоксикации [131].

Прием лекарственных препаратов (особенно бесконтрольный), таких как антибиотики, НПВП, гормоны, цитостатики, различные БАДы, наркотические и психотропные вещества и прочие, является частой причиной возникновения дисбиотических нарушений [129, 182, 190].

Таким образом, в настоящее время накоплен огромный научный потенциал понимания роли микробиома в жизнедеятельности человека. Поддержание и коррекция микрoэкологического статуса является одним из решающих условий здоровья всего организма.

1.2. Направленная коррекция дисбиоза

Выявленное свойство различных микробных культур подавлять рост других микроорганизмов, особенно патогенных, привлекает исследователей активно работать над проблемой практического применения явления микробного антагонизма. Мысль о целесообразности коррекции состава микробиоценоза при ее нарушениях, высказанная еще И. И. Мечниковым, привела к развитию нового направления в медицине – бактериальной терапии и созданию пробиотических препаратов.

В настоящее время для профилактики и лечения заболеваний, связанных с дисбиотическими нарушениями, используется широкий набор микрoэкологических средств. Наиболее популярными являются разнообразные по содержанию пробиотики, пребиотики и набирающие популярность метабиотики (постбиотики).

В научной литературе единого мнения о происхождении термина «пробиотик» нет. Некоторые авторы полагают, что он впервые был использован в 1950-е годы прошлого века немецким бактериологом, гигиенистом и нутрициологом Вернером Коллатом (1892-1970) для обозначения органических и неорганических пищевых добавок, необходимых для устранения нарушений пищеварения у пациентов, употреблявших слишком много рафинированных продуктов питания [45, 130]. Другие полагали, что понятие «пробиотики» появилось в медицинской

терминологии в 1954 г., благодаря ученому Фердинанду Верджину, который описал негативное воздействие антибиотиков на кишечную микробиоту. Бактерии, обладавшие положительными эффектами, он называл «probiotika» [183]. В дальнейшем значение термина «пробиотик» было изменено много раз. В 1965 г., исследователи Стилвелл и Лили использовали его для обозначения «субстанций, секретлируемых микроорганизмом, которые стимулируют рост других» [122, 192]. В 1974 году Р.Б. Паркер назвал пробиотиками микроорганизмы и продукцию их ферментации, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенов [20]. Чтобы подчеркнуть их микробное происхождение, ученый Рой Фуллер в 1989 году определил пробиотики, как любые пищевые добавки, содержащие живые микроорганизмы, оказывающие при введении в организм хозяина благотворное влияние [156]. В 1998 году исследователи Гурнер и Шаафсма указали на необходимость использования соответствующих доз пробиотических организмов для достижения терапевтического эффекта [121].

Согласно современной терминологии, сформулированной в 2002 году экспертами рабочей группы Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), пробиотики - это «живые микроорганизмы, которые, будучи примененными в адекватных количествах, улучшают здоровье организма-хозяина» [112]. Определение было поддержано Международной научной ассоциацией пробиотиков и пребиотиков (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) в 2013 году [117].

Пробиотики поступают на рынок в форме лекарственных препаратов, биологически активных добавок к пище, продуктов питания на основе живых организмов. Лекарственные препараты-пробиотики можно разделить на 4 основные группы [158]:

1. Монокомпонентные – содержащие один штамм пробиотических микроорганизмов;
2. Симбиотики — пробиотики из двух или более штаммов пробиотических микроорганизмов, обладающих синергидным действием;

3. Синбиотики — комплексные продукты, содержащие пробиотические штаммы микроорганизмов и стимулирующие их рост и развитие пребиотики.

4. Комбиотики — синбиотики, дополнительно обогащенные функциональными пищевыми добавками (витаминно-минеральными смесями, фенолсодержащими соединениями и т.д.).

Традиционные пробиотики изготавливают из различных штаммов живых антагонистически активных бактерий – представителей индигенной микробиоты, таких как бифидобактерии (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* и др.), лактобациллы (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum* и др.), кишечная палочка (*E. coli* Nissle 1917, *E. coli* M-17 и др.). Также к ним можно отнести пробиотические виды Стрептококков, например, *S. thermophilus*. В последние годы появляются различные препараты, содержащие пробиотические штаммы транзиторной микробиоты, которые в норме не обитают в кишечнике человека, но способны подавлять рост и размножение болезнетворных микробов. К ним относятся споровые пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и др.), эукариотические пробиотики, содержащие дрожжи родов *Saccharomyces* (*S. carlsbergensis*, *S. boulardii*) и *Aspergillus* (*A. niger*) [40, 156, 197].

Механизм действия пробиотических микроорганизмов заключается в их способности продуцировать сложные комплексы низкомолекулярных соединений в «готовом виде» или в форме предшественников, которые положительно влияют на организм человека [158]. Основными предназначениями пробиотиков являются:

1. Реабилитация индигенной микробиоты и, как следствие, восстановление ее функций [149, 157];

2. Лечение инфекционных заболеваний, за счет прямого ингибирования патогенных микроорганизмов, путем выработки различных антимикробных соединений [156];

3. Профилактика инфекционных заболеваний за счет адгезии (или коагрегации) пробиотических штаммов к эпителиальным клеткам, которая

приводит к формированию защитного барьера, препятствующего колонизации патогенных микроорганизмов [56].

4. Повышение эффективности иммунной системы, благодаря усилению продукции иммуноглобулинов, активности макрофагов и лимфоцитов, стимуляции продукции γ -интерферона. Иммунологическая стимуляция также проявляется способностью пробиотиков улучшать усвоение витаминов и минеральных соединений, способствовать образованию органических кислот и аминокислот, а также тормозить аутоагрессивные и аллергические реакции [137, 184];

5. Улучшение процессов пищеварения за счет синтеза пищеварительных ферментов [209];

6. Детоксикация организма за счет способности низкомолекулярных соединений пробиотических микроорганизмов нейтрализовать токсины и вредные метаболиты [158].

Разнообразие пробиотических культур, используемых в качестве основ лекарственных препаратов, связано со штаммоспецифичным набором функций [40, 156, 198]. Поэтому поиск наиболее эффективных штаммов сегодня продолжает оставаться актуальной задачей исследователей.

Однако по мере возрастания разнообразия пробиотиков и частоты их использования, а также благодаря появлению новых знаний о микробиоте человека, появился ряд критических замечаний. Согласно многим недавним научным наблюдениям, использование препаратов на основе живых «хороших микроорганизмов» является не самым эффективным и безопасным путем коррекции микрoэкологических нарушений. Следует учитывать, что при прохождении через желудочно-кишечный тракт пробиотики сталкиваются с неблагоприятными условиями, такими как воздействие агрессивной кислой среды желудка, желчи и пищеварительных ферментов, которые могут снижать их жизнеспособность [18]. В ряде исследований было продемонстрировано, что применение пробиотиков существенно не влияло на состав кишечного микробиоценоза [84, 152, 178]. Эти данные, включая результаты изучения видовой, тканевой, индивидуальной специфичности, а также гетерологичности

некоторых пробиотических штаммов для организма нового хозяина (бионесовместимости с его индигенной микробиотой) свидетельствуют об отсутствии возможности с их помощью изменить уже сформировавшуюся собственную микробиоту как у здоровых людей, так и у лиц с дисбиотическими нарушениями [23]. Также, следует учитывать, что поступающие в организм пробиотические культуры могут обладать лимфоцитотоксическим действием, влияющим на способность иммунной системы пациента определять, какие микроорганизмы (свои или чужие) поступают в желудочно-кишечный тракт [27, 33]. Также, следует учитывать,

Известно, что клетки пробиотических бактерий способны перемещаться из желудочно-кишечного тракта в различные органы и системы организма-хозяина. Такая транслокация может рассматриваться как положительный фактор, способствующий системному терапевтическому эффекту, но в то же время создается риск неожиданной трансформации пробиотических штаммов в патогенные бактерии. Описаны случаи эндокардита, пневмонии, кишечных абсцессов, менингита, урологических инфекций и сепсиса, вызванных лактобациллами и бифидобактериями у людей с дефектами иммунной системы или на фоне применения антибиотиков [45, 130]. А проникновение пробиотических бактерий в брюшную полость может приводить к развитию спонтанного перитонита [23]. Также прием пробиотиков может инициировать транслокацию условно патогенной микробиоты за счет повышенной антигенной и аллергенной нагрузки на макроорганизм [29, 63].

Имеются данные о том, что некоторые пробиотики могут индуцировать в кишечнике дополнительную экспрессию новых генов. Более того, было обнаружено, что при прохождении пищеварительного тракта также могут активироваться молчащие гены самих пробиотических штаммов [74, 106]. Такая экспрессия может оказывать нежелательное или даже непредсказуемое воздействие на организм человека. В последнее время в научной литературе появляются данные, свидетельствующие о том, что пробиотические бактерии учувствуют в горизонтальном переносе враждебных генетических элементов,

включая гены антибиотикорезистентности, в кишечные комменсальные сообщества [153, 187].

В некоторых исследованиях, авторами было продемонстрировано, что пробиотические микроорганизмы, при их применении, воздействуют на верхнюю часть тонкого кишечника больше, чем на толстый [98, 187]. Это объясняет довольно частые побочные эффекты пробиотикотерапии, такие как метеоризм и вздутие живота. Избыточный рост бактерий в проксимальном отделе тонкого кишечника приводит к продукции d-молочной кислоты. D-лактоацидоз является причиной вышеперечисленных симптомов, а также затуманенности сознания, утомляемости, слабости, дезориентации и беспокойства [84, 181].

В качестве альтернативы традиционным пробиотикам предложены различные пребиотики. Они были впервые описаны в 1995 году исследователями Гибсоном и Роберфройдом как «неперевариваемые пищевые ингредиенты, которые благотворно влияют на здоровье хозяина, стимулируя активность одной или нескольких комменсальных бактерий толстого кишечника» [117]. В 2007 году определение было обновлено экспертами ФАО/ВОЗ. Они описали пребиотики как «нежизнеспособные пищевые компоненты, которые приносят пользу здоровью хозяина, связанную с модуляцией его микробиоты». Фрукты, овощи, злаки и другие съедобные растения, которые являются источниками углеводов, можно считать натуральными пребиотиками. В качестве лекарственных препаратов и пробиотических добавок используют олигосахариды грудного молока, лактулозу, производные инулина, галактоолигосахариды, фруктоолигосахариды, мальтоолиго-сахариды, циклодекстрины и лактосахарозу [101].

Пребиотики обладают огромным потенциалом для изменения микробиоты кишечника. Однако, эти модификации происходят на уровне отдельных штаммов и видов микроорганизмов, что делает их применение с целью целенаправленной коррекции микробиологических нарушений малоэффективным [156]. Потенциал пребиотиков раскрывается при совместном применении их с пробиотиками. Для описания такой комбинации Гибсон и Роберфройд ввели термин «синбиотик» [117]. Поскольку данное слово подразумевает синергию, пребиотический

компонент в таком препарате избирательно стимулирует рост и способствует выживанию в желудочно-кишечном тракте пробиотического штамма. Следовательно, подходящая комбинация обоих компонентов в одном продукте должна обеспечивать превосходный эффект по сравнению с активностью пробиотика или пребиотика по отдельности [86]. Также пребиотики рационально использовать в качестве элементов функционального питания.

Перспективным и относительно новым направлением коррекции микробиологических нарушений является разработка и внедрение препаратов на основе разнообразных функционально направленных и активных низкомолекулярных соединений микробного происхождения, не содержащих живых пробиотических микроорганизмов, получившие название метабиотики или метаболитные пробиотики, постбиотики.

Термин «метабиотик» предложен российским ученым, профессором Шендеровым Б. А. для обозначения «структурных компонентов пробиотических микроорганизмов, и/или их метаболитов, и/или сигнальных молекул с известной химической структурой, которые способны оптимизировать физиологические функции, метаболические, эпигенетические, информационные, регуляторные, транспортные, иммунные, нейрогормональные, и/или поведенческие реакции, связанные с деятельностью симбиотической (индигенной) микробиоты организма-хозяина [33, 65, 66, 195]. В зарубежной литературе часто используется термин «постбиотики», обозначающий продукты бактериального метаболизма [107, 151, 179].

Такие препараты, по сравнению с пробиотиками, обладают целым рядом преимуществ. Они имеют более длительный период сохранности, четкие мишени приложения, их лучше дозировать и контролировать, они лучше абсорбируются, распределяются по тканям и органам, быстрее и в большей степени элиминируются из организма [107, 158].

По сколько метабиотики это конечный продукт метаболизма пробиотических микроорганизмов они лишены побочных эффектов, связанных с живыми культурами и не требуют определенных условий для проявления терапевтического

действия. Их использование является более эффективным и безопасным при микробиологических дисбалансах. В эксперименте на лабораторных животных было продемонстрировано, что удаление микробных клеток из коммерческого биокомплекса «Нормофлорин-Б1» (штамм *Bifidobacterium bifidum* K1 в концентрации не менее 10×10^9 КОЕ/мл, продукты его метаболизма и пребиотик лактит) повышало эффективность препарата при коррекции антибиотик-ассоциированного дисбиоза. При этом сами бифидобактерии, удаленные из биокомплекса, не обладали способностью восстанавливать кишечную микробиоту [44].

В настоящее время на фармацевтическом рынке Российской Федерации наиболее известными метабиотиками, используемыми в клинической практике, являются [43]:

1. Хилак Форте, представляющий собой капли для приема внутрь, содержащие метаболиты штаммов *Escherichia coli* DSM 4087, *Enterococcus faecalis* DSM 4086, *Lactobacillus acidophilus* DSM 4149, *Lactobacillus helveticus* DSM 4183, а также вспомогательные вещества: натрия фосфат гептагидрат, дикалия фосфат, молочная кислота, фосфорная кислота, калия сорбат, лимонной кислоты моногидрат и вода;

2. Бактистатин – капсулы, содержащие метаболиты штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ №В-2335 иммобилизованные на цеолите, ферментированный гидролизат соевой муки и вспомогательное вещество стеарат кальция (или аэросил);

3. Томицид - раствор для местного и наружного применения, содержащий метаболиты и структурные компоненты штамма *Streptococcus* sp. ТОМ-1606.

4. Актофлор С - раствор для приема внутрь, содержащий комплекс аминокислот и органических кислот – аналогов метаболитов пробиотических бактерий, таких как янтарная кислота, L-лизина гидрохлорид, L-глутаминовая кислота, L-метионин, L-валин, L-аланин, L-лейцин, глицин, L-аспарагиновая кислота, натрия ацетат, D, L-молочная кислота, муравьиная кислота, а также вспомогательные вещества натрия гидроксид и вода.

5. Дайго - раствор для приема внутрь, представляющий собой ферментированный экстракт соевого молока, содержащий метаболиты 16-ти штаммов 16 штаммов бактерий *Lactobacillus* spp.

Многочисленные литературные данные, посвященные клиническому использованию данных препаратов, свидетельствуют об их высоком терапевтическом потенциале. Например, применение Хилак Форте взрослыми пациентами и детьми с острыми кишечными инфекциями неустановленной этиологии, а также с дизентерией, сальмонеллезом, криптоспоридиозом, ротавирусной инфекцией способствовало более быстрой ликвидации интоксикации и нормализации стула, в сравнении с традиционными пробиотиками [62]. Бактистатин эффективен для купирования явлений желудочной и кишечной диспепсии у пациентов с кислотозависимыми заболеваниями верхних отделов ЖКТ. Также, данный препарат значительно повышает эффективность коррекции внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы у больных хроническим панкреатитом [50]. Клиническое применение Томицида показало его эффективность при тонзиллите, некоторых дерматологических заболеваниях, осложненных вторичных гнойных инфекциях и острых респираторных заболеваний [10]. В результате приема метабиотика Актофлор-С наблюдалась положительная динамика у пациентов с целиакией, ассоциированной с констипацией. Отмечалось купирование симптомов диспепсии и нормализация стула [47].

Таким образом, накопленный опыт клинического применения пробиотиков выявил ряд проблем пробиотикотерапии и определил необходимость создания новых средств для коррекции дисбиотических нарушений. Перспективными препаратами стали бесклеточные метабиотики. В настоящее время охарактеризовано большое количество пробиотических микроорганизмов с различным спектром действия. Разработка метабиотиков на основе таких штаммов позволит расширить номенклатуру лекарственных препаратов для эффективной терапии микробиологических нарушений. Выделение и характеристика их

действующего начала повышает предсказуемость результатов, увеличивает безопасность используемого препарата.

Продуцентом большого количества биологически активных низкомолекулярных соединений, полезных для человека, являются пробиотические штаммы бактерий рода *Bacillus*.

1.3. Бактерии рода *Bacillus* – продуценты биологически активных веществ, перспективных для создания новых пробиотических препаратов

Род *Bacillus* – аэробные или факультативно аэробные спорообразующие грамположительные палочковидные (прямые палочки, средний размер которых $0,5-2,5 \times 1,2-10$ мкм, с закругленными или обрубленными концами, часто в парах или цепочках) бактерии, относящиеся к семейству *Bacillaceae*, порядку *Bacillales*, классу *Bacilli*, типу *Firmicutes*. Традиционно их относят к почвенным микроорганизмам. Однако данные бактерии широко распространены в окружающей среде и могут быть выделены из различных источников, включая воду, воздушную пыль, пищевые продукты и тд. В отношении человека и животных они являются важным компонентом транзиторной (экзогенной) микробиоты [55, 79, 198].

Родовое название *Bacillus* было впервые введено в 1872 году немецким микробиологом, ботаником, одним из основателей бактериологии Фердинандом Юлиусом Коном (1828-1898) для палочковидных бактерий, растущих в виде нитей. В 1876 г. Кон и Роберт Кох независимо друг от друга показали, что два из трех известных видов этого рода, *B. subtilis* и *B. anthracis*, образуют высокоустойчивые к нагреванию эндоспоры, которые не гибнут при кипячении [57].

В настоящее время род *Bacillus* насчитывает около 80 видов бактерий, большинство из которых не опасны для человека. Исключением являются *B. anthracis* – возбудитель сибирской язвы и *B. cereus* – условный патоген, способный вызывать ряд оппортунистических инфекций (бактериемия/септицемия, эндокардит, менингит, инфекции ран, ушей, глаз, дыхательных и мочевыводящих

путей, желудочно-кишечного тракта), а также пищевые отравления [108]. Наиболее известным и тщательно изученным является вид *B. subtilis* (сенная палочка).

Bacillus subtilis – подвижные (перитрихи) грамположительные крупные палочки с закругленными концами (1,0-1,3 x 4,6-5,5 мкм), образуют центральную овальную спору. Являются хемоорганотрофами и факультативные анаэробами [104]. Представители этого вида считаются одними из самых древних микроорганизмов на нашей планете, что объясняет очень хорошую приспособленность людей и других сложных эукариотических организмов к данным бактериям [168]. Описание сенной палочки впервые представил в 1835 г. знаменитый немецкий естествоиспытатель Христиан Готфрид Эренберг (1795-1876). В его трактовке этот микроорганизм носил название *Vibrio subtilis* [102]. В 1872 г. благодаря Кону сенная палочка получила свое современное название.

Многолетние исследования показали, что *B. subtilis* безвредны для человека. Это позволило регулирующим органам США (Управление по контролю за качеством продовольственных и лекарственных средств - FDA), Европейского Союза (Европейское агентство по безопасности пищевой продукции - EFSA), России (Роспотребнадзор) и других стран признать штаммы этих бактерий безопасными. FDA присвоило *B. subtilis* статус GRAS (generally regarded as safe), что является обязательным условием для их применения в производстве лекарственных препаратов [20, 158].

Бактерии рода *Bacillus* являются наиболее перспективной группой микроорганизмов для современной биотехнологии и вызывают большой интерес исследователей, и практических работников различного профиля. Это связано с тем, что данные микроорганизмы являются одними из самых мощных продуцентов биологически активных вторичных метаболитов (до 800 соединений) [195].

Бациллы считаются вторыми по масштабам продуцентами антибиотических веществ, подавляющих рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, после молочнокислых бактерий, отличающихся от последних широким

антимикробным спектром [102, 146]. Различные виды бактерий рода *Bacillus* продуцируют противомикробные метаболиты четырех основных классов [15, 25]:

1. основные пептиды (например, эдеин), подавляющие синтез белка в рибосомах за счет ингибирования мРНК;
2. циклические олигопептиды (например, бацитрацин), влияющие на биосинтез пептидогликана и ингибирующие синтез стиролов;
3. линейные олигопептиды (например, полимиксин), действующие на мембранные функции путем встраивания между белками и липидами мембранных структур микроорганизмов, приводя их к необратимым изменениям;
4. аминогликозидные антибиотики (например, бутиразин), которые обладают способностью нарушать функционирование 30 S-субчастицы рибосомы и, таким образом, влиять на синтез белковых соединений.

Штаммы *B. subtilis* синтезируют такие антибактериальные вещества, как атерримины А и В, бацилипины А и В, бацилизин, бацилломиксин, бациллин, глобицин, итурин, ксантелин, неоцидин, обутин, петрин, полихлорсубтилин, ризобацидин, субтилин, субтенолин, субтилизин, трипанотоксин, флювомицин, эндосубтилизин, эумицин. А также антимикотические субстанции - *Aspergillus*-фактор, бацилломицин, бульбиформин, датемицин, дебарииоцидин, истеидин, микосубтилин, микобациллин, ризостония, субспорин, токсимицин, фунгистатин, фунгоцин [15, 21, 25]. *B. licheniformis* продуцируют бацитрацин и экстрацеллюлярный полисахарид EPS-1 [77, 109]. *B. brevis* образуют антибиотик тиротрициновой группы грамицидин С [81]. *B. thuringiensis* синтезируют такие противомикробные вещества, как бактарицин F4, энтомоцин 9, точицин [87, 99]. *B. pumilus* продуцируют антибиотики полимиксин М, полимиксин В и фузарицидин [142]. *B. circulans* образуют бутирозин [85]. *B. cereus* являются продуцентами антибиотика циспентактин [21]. *B. megaterium* синтезируют белок, состоящий из продуктов летального синтеза – мегацин [91]. *B. coagulans* образуют бактерициноподобный пептид коагулин [133]. *B. polyfermenticus* продуцируют полифермицитин [21].

Некоторые из перечисленных антибиотических веществ широко применяются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и др. Это полимиксины, колистин, бацитрацин, тиротрициновый комплекс (линейный грамицидин + тироцидин), грамицидин С, субтилилин, эдеин, бутирозин [15].

Стоит отметить, что бациллярные противомикробные метаболиты не активны в отношении индигенной микробиоты. Некоторые виды, включая *B. subtilis*, стимулируют размножение симбиотических лактобацилл и бифидобактерий [158].

Синтез бациллами антибиотических субстанций наиболее полно реализуется при подобранных оптимальных условиях культивирования. Одним из значительных факторов, влияющих на биосинтез, является состав питательной среды. При этом, для определенного вида или штамма необходим индивидуальный подход подбора компонентов [9, 19, 76].

Бактерии рода *Bacillus* при своем росте активно используют различные источники азота, которыми могут служить как органические вещества – белки, пептиды, свободные аминокислоты, так и неорганические – аммониевые соли серной, соляной или азотной кислоты [76]. При исследовании потребления различных аминокислот было установлено, что *B. cereus* активно потребляли аргинин, треонин, серин, глутамин, валин; *B. megaterium* – валин и метионин; *B. pumilus* – серин, метионин, изолейцин; *B. macerans* – метионин. Поэтому в питательные среды добавляют отдельные аминокислоты, специфичные для исследуемого штамма или белковые гидролизаты, содержащие различные аминокислоты и пептиды [21].

Источники углерода питательной среды, подобранные в оптимальных концентрациях, являются наиболее значимыми для синтеза противомикробных метаболитов [76]. В экспериментах по культивированию штамма *B. subtilis* 168 – продуцента дипептидного антибиотика бацилизина было установлено, что добавление глюкозы и сахарозы обеспечивало наилучший выход целевого продукта. При этом мальтоза, ксилоза и рибоза ингибировали выработку противомикробного метаболита [134]. Сходный эффект отмечен при изучении синтеза бацитрацина штамма *B. licheniformis* 28 КА [22]. При изучении влияния

различных углеводов на продукцию антимикробных веществ штамма *B. pumilus* «Пашков» было установлено, что лактоза стимулировала синтез антимикробных веществ сильнее, чем маннит, инулин и мальтоза [21]. Внесение в питательную среду 1% глюкозы стимулировало синтез бацитрацина у *B. subtilis* I. Отсутствие или переизбыток данного углевода приводило к резкому снижению продукции антибиотика [76]. С целью получения антимикотических метаболитов штамма *B. amyloliquefaciens* подобрана оптимальная концентрация глюкозы – 5 г/л, а для повышения противомикробных свойств *B. specie* SAT-4 добавляли 2% глюкозу [169, 186]. Увеличение концентраций углеводов в питательных средах может приводить к активному снижению pH. Это связано с образованием из глюкозы органических кислот (уксусной и пировоградной), которые ингибируют синтез антибиотиков [15, 25].

Фосфор является очень важным элементом питательной среды, источником которого наиболее часто является K_2HPO_4 . Он обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также оказывает существенное влияние на биосинтетические процессы. Так, например, при культивировании штамма *B. subtilis* 168 добавление фосфатов в питательную среду стимулировало синтез бациллизина [134].

За счет карбоксильных групп пептидогликана и фосфатных групп тейховых кислот клеточная стенка бацилл имеет анионную природу и характеризуется высокой способностью к иммобилизации положительно заряженных катионов металлов – Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , что влияет на синтез противомикробных метаболитов [66].

Наиболее эффективным способом получения вторичных метаболитов является глубинное периодическое культивирование бактерий. Такой метод позволяет штаммам-продуцентам на определенной фазе роста синтезировать вторичные метаболиты в культуральную жидкость [7]. Образование антибиотических веществ спорообразующих бактерий происходит обычно в логарифмической фазе роста [15, 25]. Однако, для некоторых бацилл свойственны и другие сроки их продукции. Например, *B. subtilis* и *B. licheniformis* синтезировали

максимальное количество противомикробных метаболитов в конце логарифмической фазы, перед началом активного спорообразования [113, 150]. Также было отмечена способность некоторых штаммов продуцировать их в процессе стационарной фазы. Выход антагонистически активного экзополисахарида штаммов *B. subtilis* 39 и *B. subtilis* 54 начинался в логарифмической фазе и достигал максимума в стационарной фазе через 10-12 часов от ее начала [21]. Интенсивная продукция антибиотических веществ в разные периоды стационарной фазы наблюдалась у *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* [82, 87, 99, 166].

Широко дискутируется вопрос о взаимосвязи синтеза противомикробных метаболитов со спорообразованием. Ряд исследователей выявляли отсутствие зависимости [90, 113, 161]. Другие авторы, наоборот, подтверждали ее наличие [49, 147].

Так как бактерии рода *Bacillus* являются аэробами (факультативные аэробы) для полноценного роста и биосинтеза им необходим кислород, для обеспечения которого в процессе культивирования используется аэрация или перешивание [78]. Показано, что бациллы активно синтезируют антибиотические вещества при выращивании в термошейкере со скоростью около 200 об/мин [2].

Температура также является важным фактором, влияющим на биосинтез противомикробных метаболитов. По данным литературы, температурный оптимум для различных представителей бацилл варьируется от 25 °С до 55 °С [2, 71, 105, 111].

Бактерии рода *Bacillus*, кроме продукции антибиотических веществ, известны своими полиферментативными свойствами, которые обеспечивают им возможность существовать в разнообразных субстратах. Бациллы продуцируют ферменты четырех классов [15, 25]:

1. Гидролазы: аминопептидаза, субтилопептидаза, плазмин, ксиланаза, фосфодиэстераза, α - и β -амилазы, дезоксирибонуклеаза, аргиназа, β -ацетилглюкозаминидаза, фосфотаза, мальтаза, эстераза, ламинариназа;
2. Лиазы: треониндегидратаза, пекгатлиаза, альдолаза, аконитаза;

3. Трансферазы: пируваткиназа, левансахараза, рибонуклеаза;
4. Оксидоредуктазы: лактатдегидрогеназа, нитратредуктаза.

У бацилл особенно хорошо развита система гидролаз - ферментов, катализирующих реакции гидролитического расщепления молекул. Среди них практический интерес представляют протеолитические ферменты. В зависимости от строения активных центров, различают четыре группы протеаз: сериновые протеазы, металлопротеазы, цистеиновые протеазы и аспартатные протеазы. Данная классификация хорошо коррелирует с оптимумами зависимости их активности от pH. Сериновые протеазы имеют оптимумы pH в щелочной области, металлопротеазы наиболее активны при нейтральных pH, а цистеиновые и аспартатные проявляют динамичность при кислых значениях pH [64].

Внеклеточные протеазы бацилл, кроме основного предназначения - расщепления белковых субстратов, выполняют ряд важных функций. Они принимают участие в разложении вегетативного клеточного материала для последующего использования в анаболических и катаболических реакциях; играют большую роль в процессе спорообразования и разрушении белковых оболочек спор во время их прорастания. Также, высказывается предположение об участии внеклеточных протеаз в синтезе полипептидных антибиотиков [15].

Протеолитические ферменты внедряются в медицинскую практику в качестве препаратов для лечения воспалительных процессов, для очистки гнойных и некротических ран, ожогов, обморожений, для растворения тромбов, лечения некоторых опухолей, а также как элементы лекарственных средств, нормализующих процессы пищеварения [110].

Среди других классов ферментов бацилл большой интерес представляют лиазы. Эти ферменты способны расщеплять экзополисахариды, являющихся основным компонентом биопленочного матрикса, и тем самым эффективно воздействовать как на формирующиеся, так и на сформированные биопленки. Бактериальные лиазы являются перспективными средствами для терапии и профилактики бактериальных инфекций, которые тяжело поддаются лечению традиционными средствами [59].

Бактерии рода *Bacillus* обладают способностью к повышенной продукции свободных аминокислот в культуральную среду. Они способны синтезировать: аргинин, аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислота, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, пролин, серин, тирозин, триптофан, треонин, фенилаланин, цистин. Изучение аminosинтетической активности различных штаммов *B. subtilis* позволило установить, что большинство из них продуцирует от 4 до 16 аминокислот. У 86% штаммов показана возможность синтеза 9—14 аминокислот, 43% штаммов этого вида синтезирует лизин; 21,5% — фенилаланин; 7% — цистин, метионин, гистидин; 3,5 % — триптофан [15, 25].

Также бациллы способны образовывать короткоцепочечные жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная, изобутиратная, изовалериановая), пуриновые нуклеотиды (инозит, гипоксантин, гуанозин), витамины группы В (тиамин, рибофлавин, никотиновая и пантотеновая кислоты, пиридоксин, инозит, кобаламин) [25, 195].

Среди метаболитов, секретируемых *B. subtilis*, был охарактеризован пептид, ассоциированный с чувством кворума («Quorum sensing») этих бактерий, который принимает участие в коммуникации, пролиферации и спорообразовании. В экспериментах на лабораторных мышах продемонстрирована его способность оказывать противовоспалительное действие, за счет подавления провоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-7), усилению противовоспалительного ИЛ-10 и индукцией цитопротекторного белка теплового шока Hsp27 в эпителии кишечника [94].

Приведенные данные свидетельствуют о высокой биологической активности бактерий рода *Bacillus*, широком спектре синтезируемых веществ, имеющих огромное значение для современной биотехнологии и медицины. Наиболее перспективные, охарактеризованные штаммы этих микроорганизмов могут служить в качестве продуцентов для создания пробиотических препаратов нового поколения – метабиотиков.

Известен штамм *B. subtilis* ЗН, составляющий основу лекарственного препарата-пробиотика «Бактиспорин». Он получен в результате селекции

культуры *B. subtilis* 534. Штамм обладает высокой антагонистической активностью в отношении широкого круга патогенных и условно патогенных микроорганизмов: подавляет рост стафилококков, протей, патогенной кишечной палочки, сальмонелл, шигелл, дрожжевых грибов, стрептококков и синегнойной палочки. Продуцирует гидролитические (протеаза, амилаза, целлюлаза) и литические (каталаза, лецитиназа) ферменты. Препарат «Бактиспорин», содержащий в одной дозе от 1×10^9 до 5×10^9 КОЕ/мл штамма *B. subtilis* 3Н, безвредный, хорошо переносим и обладает лечебным действием, о чем свидетельствуют его клинические испытания. Высоко эффективен при коррекции антибиотик-ассоциированного дисбиоза. Также применяется при расстройствах ЖКТ, ферментной недостаточности, гнойных и инфекциях, для лечения и профилактики хирургических инфекций мягких тканей [48, 64].

В микробиологической лаборатории ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова г. Москва выделен в естественных условиях штамм *B. subtilis* 1719. Он проявляет выраженную антагонистическую активность в отношении шигелл (*S. flexneri* и *S. sonnei*), золотистого стафилококка, протей (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*), патогенной кишечной палочки, синегнойной палочки и *Candida albicans*. Штамм безвреден, не токсичен, авирулентен. Стимулирует рост лактобацилл и полезной кишечной палочки. Обладает иммуностимулирующим действием на макроорганизм. Продуцирует комплекс гидролитических ферментов, таких как протеаза, амилаза, липаза [19, 20, 51].

Характеристика данных штаммов позволяет сделать вывод об их перспективности. Изучение биологических свойств метаболитов этих культур представляет интерес для дальнейшего практического применения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Штаммы микроорганизмов

В качестве продуцентов метаболитов в работе использовали штаммы *Bacillus subtilis* ЗН, *Bacillus subtilis* 1719. Для определения противомикробной активности метаболитов применяли тест-штаммы условно-патогенных бактерий – *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Staphylococcus aureus* 29213, *Proteus mirabilis* 24a, *Escherichia coli* ATCC 25922 и грибов – *Candida albicans* 927. Все культуры из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова.

2.1.2. Питательные среды

Для глубинного культивирования бацилл применялись питательные среды (далее – ПС) известного состава, используемые в производстве споровых пробиотиков, и среды, рекомендуемые в литературе:

1. Среда № 9 (г/л): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 (Реахим, Россия); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 (Реахим, Россия); MnCl_2 – 0,01 (Лабтех, Россия); CaCl_2 (Лаверна, Россия) – 0,08; пептон – 5,0 (HiMedia, Индия); глюкоза – 10,0 (PanReac/AppliChem, США); дрожжевой экстракт – 3,0 («HiMedia», Индия); pH 7,3.

2. Среда № 5 (г/л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 (Лабтех, Россия); $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 2,0 (Мосреактив, Россия); $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 (Лаверна, Россия); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 (Химмед, Россия); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,004 (Химмед, Россия); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0005 (Реахим, Россия); CaCl_2 – 0,165 (Лаверна, Россия); $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 (Реахим, Россия); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 (Реахим, Россия); пептон – 5,0 (HiMedia, Индия); pH 7,3.

3. LB-бульон (г/л): триптон – 10,0 (HiMedia, Индия); дрожжевой экстракт – 5,0 (HiMedia, Индия); NaCl – 10,0 (Sigma, США).

4. Среда Гаузе №2 (г/л): триптон – 2,5 (HiMedia, Индия); пептон – 5 (HiMedia, Индия); NaCl – 5 (Sigma, США); глюкоза – 10 (PanReac/AppliChem, США); pH 7,2.

5. Среда ВК-2 (г/л): MnCl₂ – 0,01 (Лабтех, Россия), CaCl₂ – 0,5 (Лаверна, Россия); NaCl – 5,0 (Sigma, США); Na₂HPO₄ * 12H₂O – 2,0 (Реахим, Россия); K₂HPO₄ * 3H₂O – 2,0 (Лабтех, Россия); глюкоза 10,0 (PanReac/AppliChem, США); пептон – 10,0 (HiMedia, Индия); pH 7,3.

Для изучения качественного и количественного состава пристеночного муцина толстого кишечника использовали следующие среды:

1. Питательная среда №10 для выделения стафилококков (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) с добавлением яичного желтка

2. Агар Эндо, питательная среда для выделения энтеробактерий (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия)

3. Лактобакагар, питательная среда для выделения и культивирования лактобацилл (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия)

4. Питательная среда №2 (Сабуро), для выделения грибов (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия)

5. ГРМ-агар (питательный агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) с добавлением 5% стерильной дефибринированной лошадиной крови (ЗАО Эколаб, Россия)

6. UriSelect 4, хромогенный агар для выделения уропатогенных бактерий (Bio-Rad, Франция)

7. Bifidobacterium agar, для выделения бифидобактерий (HiMedia, Индия)

8. Полужидкая печеночно-цистеиновой среда Блаурокка (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) для выделения бифидобактерий

9. Schaedler Agar, для выделения строгих анаэробов или факультативно-анаэробных бактерий (HiMedia, Индия)

В ходе экспериментов посевы производили на мясо-пептонный бульон (далее – МПБ), мясопептонный агар (далее – МПА) (НПО «Питательные среды», Россия), агар Мюллера-Хинтона (CONDA, Испания).

2.1.3. Экспериментальные животные

Эксперименты по безвредности метаболитов проводили на беспородных белых мышах одного пола, массой 14-16 г. Пробиотическое действие метаболитов при лекарственном дисбиозе изучали на мышах линии BALB/c одного пола, массой 18-20 г. Лабораторные животные получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Андреевка»).

Животных содержали в идентичных условиях вивария (температура, относительная влажность, освещение и рацион питания) в соответствии с межгосударственным стандартом (ГОСТ 33217-2014). Протоколы экспериментов утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Животных выводили из экспериментов декапитацией под легким эфирным наркозом, с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы. Страсбург, 2004 г.).

2.1.4. Коммерческие препараты

Бактистатин (Крафт, Россия) – БАД, содержащая метаболиты штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ №В-2335 иммобилизованные на цеолите, ферментированный гидролизат соевой муки и вспомогательное вещество стеарат кальция (или аэросил). Регистрационное удостоверение № RU 77.99.88.003.Е.001019.03.19 от 21.03.2019 г. В настоящем исследовании Бактистатин использовали в качестве референс-препарата для оценки пробиотического действия метаболитов штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 в экспериментах *in vivo*.

Гентамицин (Дальхимфарм, Россия) – антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов. Регистрационное удостоверение № Р N003879/01 от 03.11.2009 г. Использовался для моделирования лекарственного дисбиоза у лабораторных животных.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Культивирование микроорганизмов

Для поверхностного культивирования *B. subtilis* ампулы с лиофилизированными штаммами вскрывали и подращивали в стеклянных пробирках с МПБ в течение 4-5 часов в термостате при температуре 37 °С. Далее производили посев материала на МПА. Бактерии инкубировали в термостате в течение 24 часов при температуре 37 °С.

Для глубинного периодического культивирования выросшие клетки второго пассажа смывали стерильным физиологическим раствором, суспензировали и вносили в колбы Эрленмейра, заполненные жидкой питательной средой на 25% от общего объема. Конечная концентрация бацилл соответствовала 2 степени по шкале Mc Farland. Колбы погружали в шейкер-инкубатор ES-20 (BioSan, Латвия) и инкубировали при температуре 37 °С и перемешивании со скоростью 220 об/мин.

Для культивирования тест-штаммов условно-патогенных бактерий ампулы с лиофилизированными культурами вскрывали и подращивали на МПБ в течение 4-5 часов. Затем высевали на МПА и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 16 часов. Для выращивания *C. albicans* использовали агар Сабуро и термостатировали в течение 18 часов при температуре 25 °С. В эксперимент брали культуры второго пассажа.

Для контроля чистоты культур (отсутствие посторонней флоры) на каждом этапе производилась оценка морфологических и тинкториальных свойств микроорганизмов.

2.2.2. Изучение динамики роста исследуемых штаммов

Для изучения динамики роста *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 в процессе глубинного периодического культивирования каждые 6 часов отбирали пробы культуральной жидкости и измеряли оптическую плотность (далее – ОП) на

спектрофотометре Genesys 6 (Thermo Scientific, США) при длине волны 600 нм. На основе полученных данных строили кривые роста исследуемых штаммов в программе Microsoft Office Excel.

2.2.3. Получение метаболитов

Для получения исследуемых метаболитов проводили глубинное периодическое культивирование штаммов *B. subtilis*. Выращенную биомассу отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter Life Sciences, США) со скоростью 8000 об/мин в течение 30 минут. Супернатанты, содержащие метаболиты, стерилизовали методом микрофльтрации при помощи мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм («Millex», Ирландия).

2.2.4. Методы изучения противомикробной активности

Цитотоксическую активность метаболитов в отношении тест-штаммов изучали спектрофотометрическим методом по поглощению красителя бромкрезолового пурпурного клетками с нарушенной мембраной [53]. В аликвоту образца (фильтраты, содержащие метаболиты *B. subtilis*), равную 500 мкл, собранную в широкую пробирку типа Эппендорф с V-образным дном, добавляли по 50 мкл суспензий свежих клеток тест-штаммов. Конечная концентрация микроорганизмов составляла $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. В качестве контроля использовали физиологический раствор (500 мкл 0,9% NaCl + 50 мкл суспензии клеток). В каждом эксперименте использовали по 3 опытных и контрольных пробирки. Тест-штаммы инкубировали при температуре 32 °C в течение 2 часов в условиях перемешивания. Далее клетки отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге 5424 R (Eppendorf, Германия) со скоростью 16000 об/мин в течение 5 минут. Супернатанты осторожно удаляли тонким наконечником. К осадкам добавляли по 300 мкл раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере

pH 4,6 (ОП₄₄₀= примерно 0,6 ед). Смесь аккуратно суспендировали, чтобы не повредить клетки, и инкубировали при температуре 32 °С в течение 45 минут в условиях перемешивания. Затем пробирки центрифугировали при 16000 об/мин в течение 5 минут, супернатанты отбирали в отдельные пробирки для каждой пробы и оттуда по 50 мкл вносили в заранее подготовленные пробирки, содержащие по 2,5 мл фосфатного буфера pH 4,6. Полученные растворы перемешивали и измеряли ОП на спектрофотометре при длине волны 440 нм в кюветах 1 см. Из трех повторов для каждой пробы вычисляли среднее значение ОП и производили расчет противомикробной активности (далее – ПА) по формуле:

$$ПА = (ОП_{\text{контр.}} - ОП_{\text{опыт.}}) * 100 / ОП_{\text{контр.}}, \text{ где}$$

ОП_{контр.} – среднее значение ОП смеси из контрольных пробирок;

ОП_{опыт.} – среднее значение ОП смеси из опытных пробирок.

Бактериостатическую активность метаболитов в отношении тест-штаммов изучали методом диффузии в агар. Для этого в чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона производили посев тест-штаммов в концентрации, соответствующей 0,5 степени по шкале Mc Farland. Далее в чашках проделывали лунки с диаметром 9 мм и добавляли по 100 мкл исследуемых метаболитов. Результаты оценивали через 18 часов инкубации при температуре 37 °С по диаметру зон задержки роста тест-штаммов вокруг лунок.

2.2.5. Методы определения ферментативной активности

Протеолитическую активность метаболитов *B. subtilis* оценивали по способности гидролизовать казеин. Для этого в чашках Петри с молочным агаром проделывали лунки с диаметром 9 мм. В них закапывали по 0,1 мл фильтратов, содержащих исследуемые метаболиты. Через сутки инкубации при температуре 37 °С оценивали результат по появлению прозрачных зон гидролиза вокруг лунок.

Амилолитическую активность метаболитов *B. subtilis* оценивали по способности гидролизовать крахмал. Для этого в чашках Петри с картофельным агаром проделывали лунки с диаметром 9 мм. В них закапывали по 0,1 мл

фильтратов, содержащих исследуемые метаболиты. После инкубации в течение суток при температуре 37 °С агар заливали раствором Люголя. Появляющиеся светлые зоны вокруг лунок свидетельствовали о гидролизе крахмала.

2.2.6. Метод определения биопленкообразования микроорганизмов

Биопленкообразование (далее – БПО) изучали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного полистеролового стерильного планшета [174].

Для проведения эксперимента готовили ряд проб:

1. Опытная: 0,3 мл метаболитов, 2,6 мл питательного бульона и 0,1 мл микробной взвеси. Общий объем составлял 3 мл. Таким образом, изначальную концентрацию метаболитов разводили в 10 раз. При данной конечной концентрации метаболиты самостоятельно не проявляли исследуемого свойства, но стабильно сохраняли свое влияние на исследуемые культуры микроорганизмов.

2. Контроль 1: 0,1 мл микробной взвеси и 2,9 мл питательного бульона. Для определения исходного уровня биопленкообразования тест-штаммов.

3. Контроль 2: стерильный питательный бульон.

Конечная концентрация микроорганизмов составляла $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Полученные взвеси инокулировали в 96-луночный планшет микропипеткой-дозатором по 150 мкл в 3 повторах. Планшеты закрывали крышкой и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение суток. После инкубации из лунок планшета удаляли планктонные клетки тест-штаммов и окрашивали полученные биопленки. Для этого все лунки заполняли по 200 мкл 0,1% кристалл-виолетом и выдерживали при комнатной температуре в течение 45 минут. После тщательного трехкратного промывания дистиллированной водой в лунки для экстракции красителя из биопленки вносили по 200 мкл 96 % этилового спирта. Интенсивность сформировавшихся биопленок количественно оценивали по показаниям окрашивания спирта кристалл виолетом на планшетном спектрофотометре «Multiskan-Ascent» (Termo-Labsystems, Финляндия) при длине волны 690 нм.

Биопленкообразование тест-штаммов оценивали с использованием коэффициента КПО [8]:

$$\text{КПО} = \text{ОП}_{\text{опыт.}} / \text{ОП}_{\text{контр.}}, \text{ где}$$

КПО - коэффициент биопленкообразования, представляющий собой отношение оптической плотности изучаемой культуры (опыт) к оптической плотности питательного бульона (контроль), ед.;

$\text{ОП}_{\text{опыт.}}$ - оптическая плотность изучаемой культуры, в ед. ОП690;

$\text{ОП}_{\text{контр.}}$ - оптическая плотность питательного бульона, в ед. ОП690;

Способность формировать биопленки выражали в условных единицах (ед).

2.2.7. Фракционирование метаболитов

Белковые фракции исследуемых метаболитов осаждали путем добавления 10% раствора трихлоруксусной кислоты (далее – ТХУ) с последующем центрифугированием со скоростью 3000 об/мин в течение 30 минут.

Для фракционного разделения исследуемых метаболитов по молекулярной массе использовали метод ультрафильтрации с применением центрифужных концентраторов, оснащенных мембранами с номинальным молекулярным отсечением по молекулярной массе 30 и 5 кДа (Merck, Германия).

2.2.8. Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэмбли

К исследуемым пробам добавляли равный объем буфера для растворения белков (0,0625 М TrisHCl pH 6,8, содержащий 2% SDS; 5% 2-меркаптоэтанола; 0,01% бромфенолового синего; 10% глицерина). Образцы кипятили в течение 5 минут и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1 минуты. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле с содержанием полиакриламида 12% в камере VF-1 («Хеликон», Россия). Для его приготовления использовали водный раствор акриламида (40% акриламид; 1% N,N-метиленбисакриламид); буфер 1,5 М Tris-HCl, pH 8,0; буфер 0,5 М Tris-HCl, pH 6,8. Для полимеризации добавляли 10%

раствор ПСА и TEMED. Для приготовления разделяющего геля использовали 2,25 мл 0,5 М Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 мл H₂O; 1,75 мл раствора акриламида. Перед заливкой добавляли 225 мкл 10% раствора ПСА и 2,25 мкл TEMED. Для приготовления концентрирующего геля использовали 1,25 мл 0,5 М Tris-HCl, pH 6,8; 1 мл H₂O; 0,25 мл раствора акриламида. Перед заливкой добавляли 125 мкл 10% раствора ПСА и 1,25 мкл TEMED.

Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (0,025 М Tris; 0,193 М глицин; 0,1% SDS; р 8,3), силу тока выставляли 15 мА. По окончании процесса оставшиеся белки в геле окрашивали с помощью Coomassie brilliant blue R-250 (0,25% Coomassie brilliant blue R-250; 45,4% этанол; 9% уксусная кислота) в течение 1-2 часов. Отмывали гель в водном растворе, содержащем 7% уксусной кислоты и 25% этанола.

2.2.9. Метод проточной цитометрии

Уровень цитокиноподобных веществ (далее – ЦПВ) в метаболитах определяли с помощью набора «Human Inflammation 18-Plex Kit» («Antigenix America», США) на проточном цитометре FC-500 («Beckman Coulter», США) в соответствии с инструкцией производителя. В качестве контроля использовали нативную питательную среду (далее – НПС).

В планшет из состава набора вносили раствор частиц и удаляли жидкость с помощью центрифугирования со скоростью 4000 об/мин в течение 5 минут. Для построения калибровочной кривой добавляли стандартные разведения (1, 1/3, 1/9, 1/27, 1/81, 1/243, 1/729) эталонной смеси цитокинов и исследуемые образцы. Планшет инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре на шейкере со скоростью вращения 700 об/мин. После инкубации в лунки добавляли по 100 мкл промывочного буфера, удаляя жидкость центрифугированием в течение 5 минут. Данную операцию повторяли три раза. Далее во все лунки добавляли раствор биотинилированных антител и инкубировали планшет в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере со скоростью вращения 700 об/мин. После

инкубации трижды промывали лунки промывочным буфером. Затем в лунки добавляли раствор конъюгата стрептавидина-фикоэритрина и инкубировали планшет в течение 20 минут при комнатной температуре на шейкере со скоростью вращения 700 об/мин. После инкубации лунки промывали дважды, добавляли буфер для проточной цитометрии, ресуспендировали частицы и переносили суспензии в цитометрические пробирки.

Образцы анализировали на проточном цитометре FC-500. Полученные данные обрабатывали при помощи программы Flow Cytomix Pro 2.3 с предоставленным производителем набора настроечным плагином.

2.2.10. Метод хромато-масс-спектрального анализа

Для проведения эксперимента готовили опытные пробы, содержащие метаболиты *B. subtilis*, полученные в разные периоды культивирования (8 ч, 24 ч, 30 ч, 48 ч). В качестве контроля использовали НПС.

3 мл исследуемого раствора наносили на колонку для ТФЭ Chromabond C18ec 100 мг (Macherey-Nagel, Германия), промывали 5 мл 5% р-ра ацетонитрила в воде и смывали с колонки 1 мл ацетонитрила.

ВЭЖХ-МС анализ проводился на квадрупольно-времяпролетном масс-спектрометре высокого разрешения Impact II (Bruker Daltonik, Германия), оснащённым источником ионизации электрораспылением Apollo II (Bruker Daltonik, Germany) и УВЭЖХ Elute (Bruker Daltonik, Германия) на обращённо-фазовой колонке Waters Acquity HSS T3 1.8 мкм 2.1 × 100 мм (Waters, Ирландия) в следующих условиях: скорость потока 0.4 мл/мин. с постколоночным делением потока 1:20, градиентное элюирование от 5% до 95% Б за 22 мин. (А: 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде, Б: 0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле), температура колонки 35 °С, объём вкола 3 мкл, ионизация электрораспылением в режиме положительных ионов, потенциал на капилляре 4.5 кВ, распыляющий газ – азот 0.7 бар, осушающий газ – азот 6 л/мин 200 °С, диапазон сканирования m/z 130-1000, частота сканирования для полного спектра 6 Гц, автоматический режим

регистрации спектров второго порядка (активация соударением) с динамической частотой регистрации 2–6 Гц, столкновительный газ – азот, энергия соударений 20 и 50 эВ, автоматическая внутренняя калибровка по раствору трифторацетата натрия. Обработка спектров, идентификация компонентов и полуколичественный анализ осуществлялись с использованием программного пакета Metaboscape 4.0.4 (Bruker Daltonik, Германия).

2.2.11. Изучение безвредности метаболитов

Изучение безвредности метаболитов проводили в соответствии с методическими рекомендациями ОФС.1.7.2.0001.15. «Безопасность пробиотиков в тестах *in-vivo*».

Исследование проводили путем однократного введения *per os* 0,5 мл метаболитов здоровым беспородным мышам одного пола с весом 14-16 г. Учет результатов проводили в течение пяти суток по выживаемости мышей и изменению массы тела. Контролем служила группа особей, получавших *per os* 0,5 мл физиологического раствора.

2.2.12. Методика формирования экспериментального дисбиоза и его коррекции

Исследование проведено на 170 мышах линии BALB/с одного пола, массой 18-20 г. Экспериментальный антибиотик-ассоциированный дисбиоз у мышей моделировали путём ежедневного внутрибрюшинного введения раствора гентамицина в течение 5 дней [14]. Антибиотик вводили животным после расчета необходимой дозы, основанного на рекомендованной среднесуточной дозировке для человека, с учетом межвидового переноса доз по удельной площади поверхности тела [17].

После моделирования дисбиоза было сформировано пять групп мышей, по 50 особей в каждой. Первая группа являлась контролем и включала животных,

которые получали 0,9% физиологический раствор. Вторая группа состояла из мышей с индуцированным дисбиозом без дальнейшей целенаправленной коррекции (отрицательный контроль). Животным третьей, четвертой и пятой групп с целью коррекции дисбиоза вводили метабиотики. Мыши третьей группы получали метаболиты штамма *B. subtilis* 3Н, в четвертой – метаболиты *B. subtilis* 1719. Животным пятой группы вводили метабиотик «Бактистатин».

Метабиотики вводили ежедневно интрагастрально в течение 21 дня, что является оптимальным сроком для оценки восстановления микробиоты и отсутствия признаков дисбиоза. Каждые 7 дней из всех групп выводили по 10 мышей для последующего изучения качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника.

2.2.13. Методика количественного и качественного исследования мукозной микробиоты толстого кишечника

Микробиологические исследования пристеночного муцина проводили согласно методике, предложенной Л.И. Кафарской и Н.А. Коршуновым [24].

Биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника освобождали от химуса и взвешивали в асептических условиях. Далее материал помещали в стерильный фосфатный буфер в соотношении 1:10 и выдерживали в нём 2 часа для разжижения муцина. Затем готовили разведения материала до концентраций 10^{-3} – 10^{-5} КОЕ/мл. По 0,1 мл каждого разведения взвеси засеивали газоном на поверхность питательных сред (Эндо, Сабуро, Уриселект, кровяной агар, желточно-солевой агар, лактоагар, бифидоагар, агар Шадлера) и инкубировали 1-2 суток при температуре 37 °С в аэробных и анаэробных условиях. Для выделения бифидобактерий дополнительно проводили посев 30 мкл из разведений исходного материала в пробирки с 3 мл полужидкой печеночно-цистеиновой средой Блаурокка.

Количество выделенных из биопроб микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г массы биологического материала. Удельное содержание микроорганизмов вычисляли как среднюю концентрацию микробов при условии их обнаружения.

2.2.14. Идентификация выделенных микроорганизмов

Идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе MALDI Biotyper Sirius RUO System (Bruker, США).

Для этого одну изолированную колонию культуры микроорганизма наносили одноразовой микробиологической петлей на лунку мишени специальной пластины. Сразу после высыхания биомассы мишени обрабатывали 1-2 мкл 70% муравьиной кислотой (Sigma-Aldrich, США) для экстракции микробных белков. Далее на мишени наносили 1-2 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты в водном растворе ацетонитрила и трифторуксусной кислоты) (Bruker, США) для ионизации микробных пептидов. Пластину помещали в прибор и проводили МС-идентификацию. Результат идентификации считали достоверным, если коэффициент соответствия с базой данных (Score) был больше или равен 2.0

2.2.15. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office 2016. Для проверки соответствия количественных данных нормальному распределению применяли критерий Шапиро-Уилка.

В случаях выявления значительных отклонений от нормальности или при нормальном распределении только части данных, проверка гипотезы о равенстве генеральных средних проводили с использованием непараметрических методов. Полученные данные представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1; Q3). Для сравнения двух независимых групп применяли критерий Манна-Уитни, для сравнения трех и более групп – критерий Краскела-Уоллиса. При вычислении post-hoc теста использовали метод множественных сравнений Данна.

В случае нормального или близкого к нормальному распределению экспериментальных данных, полученных в выборках, проверку гипотезы о

равенстве генеральных средних проводили с использованием параметрических методов. Полученные данные представляли в виде средних арифметических значений (M) \pm ошибки репрезентативности (m). Для сравнения двух независимых групп при условии равенства дисперсий использовали t-критерий Стьюдента. Для проверки равенства двух дисперсий применяли критерий Фишера (F-тест).

Во всех случаях статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$ [5].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Определение оптимального состава питательной среды и времени культивирования для штаммов *Bacillus subtilis*

3.1.1. Подбор оптимального состава питательной среды

Для успешного микробиологического синтеза важнейшую роль играет методика культивирования штаммов-продуцентов. Подбор оптимальных питательных сред и условий выращивания позволяет достичь максимального выхода продукции, которую данные штаммы способны синтезировать [76]. В биотехнологии используются разнообразные методы культивирования микроорганизмов для получения биологически активных веществ. Одним из наиболее распространенных является глубинное периодическое культивирование, при котором продуценты в определенной фазе роста вырабатывают биологически активные метаболиты [7]. При этом состав питательной среды оказывает существенное влияние на биосинтетическую активность культивируемых штаммов [9, 21].

Бактерии *B. subtilis*, обладая высокой адаптивностью, способны обитать в самых разнообразных экологических нишах, что позволяет им успешно развиваться на различных питательных средах при значениях рН в диапазоне от 4 до 9. Тем не менее, для достижения оптимального роста клеток и высокоэффективного синтеза биологически активных веществ в опытах *in vitro* требуется создание благоприятных условий [71, 169]. На основании этих принципов, на первом этапе данного исследования проведено культивирование исследуемых штаммов на питательных средах, используемых для выращивания бактерий *B. subtilis* (см. Главу 2, пп. 2.1.2.).

Одним из ключевых механизмов пробиотического действия бактерий *B. subtilis* является способность проявлять высокую антагонистическую активность к болезнетворным микроорганизмам, которая обусловлена синтезом широкого

спектра антибиотических соединений. Исходя из этого, в процессе культивирования изучали противомикробную активность метаболитов исследуемых штаммов. Метаболиты получали по описанной методике (см. Главу 2, пп. 2.2.3.). Для оценки противомикробной активности выбран спектрофотометрический метод (см. Главу 2, пп. 2.2.4.), который основан на измерении количества красящего вещества, проникающего в клетки через поры цитоплазматической мембраны с нарушенной целостностью. Данный метод обладает рядом преимуществ, включая возможность быстрого количественного анализа противомикробной активности образцов в течение нескольких часов. Кроме того, для проведения экспериментов не требуется большого количества питательных сред, что помогает сократить затраты на исследования.

При культивировании штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) установлено, что противомикробная активность метаболитов различалась в зависимости от состава используемой питательной среды (Таблицы 6, 7). В связи с этим представляло интерес изучить влияние ключевых компонентов, а именно источников азота и углерода, на проявление исследуемого свойства.

В качестве источников азота оценивали различные варианты гидролизатов: триптон, пептон и панкреатический гидролизат казеина (далее – ПГК). Для этого готовили 0,5%-ные растворы хлорида натрия, в которые добавляли гидролизаты с конечной концентрацией 1% в питательной среде. Бактерии *B. subtilis* выращивали в течение суток и изучали противомикробную активность их метаболитов (Таблицы 1, 2).

Из представленных данных в таблице 1 следует, что при выращивании штамма *B. subtilis* 3Н на среде с триптоном противомикробная активность проявлялась в отношении четырех из пяти тест-штаммов: *S. aureus* FDA 209P, *S. aureus* 29213, *P. mirabilis* 24a и *C. albicans* 927. При культивировании штамма *B. subtilis* 3Н с пептоном антимикробные свойства проявлялись в отношении трех тест-штаммов: *S. aureus* FDA 209P, *S. aureus* 29213, *P. mirabilis* 24a. По сравнению с триптоном достоверных различий в активности к золотистому стафилококку обнаружено не было. При этом активность в отношении штамма *P. mirabilis* 24a была достоверно

ниже. При выращивании штамма *B. subtilis* 3Н на среде с панкреатическим гидролизатом казеина противомикробные свойства отмечали в отношении только к тест-штаммам золотистого стафилококка. При этом активность была достоверно ниже по сравнению метаболитами, полученных при культивировании на среде с триптоном.

Таблица 1 – Влияние гидролизатов на противомикробную активность метаболитов *B. subtilis* 3Н

Тест-штаммы	Противомикробная активность (%), Ме (Q1;Q3), n=8		
	триптон	пептон	ПГК
<i>S. aureus</i> FDA 209P	22,91 (14,56; 24,05)	17,41 (13,18; 21,57)	4,9 (4,34; 7,13)*
<i>S. aureus</i> 29213	20,05 (13,30; 21,71)	16,51 (11,30; 17,73)	5,17 (2,12; 8,09)*
<i>P. mirabilis</i> 24a	8,65 (8,02; 10,35)	5,29 (3,69; 6,99)*	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0
<i>C. albicans</i> 927	10,01 (9,25; 12,99)	0	0
Примечание: * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с триптоном			

Из результатов, представленных в таблице 2, следует, что метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 при выращивании на среде с триптоном, обладали антибиотическими свойствами по отношению к трем из пяти тест-штаммов: *S. aureus* FDA 209P, *S. aureus* 29213, и *C. albicans* 927. При культивировании с пептоном противомикробная активность проявлялась только к тест-штаммам золотистого стафилококка и была статистически значимо ниже по сравнению с метаболитами, полученными на среде с триптоном. При выращивании на среде с панкреатическим гидролизатом казеина антибиотические свойства метаболитов *B. subtilis* 1719 не выявлены.

Исходя из полученных данных триптон был выбран в качестве оптимального компонента питательной среды.

Таблица 2 – Влияние гидролизатов на противомикробную активность метаболитов *B. subtilis* 1719

Тест-штаммы	Противомикробная активность (%), Me (Q1;Q3), n=8		
	триптон	пептон	ПГК
<i>S. aureus</i> FDA 209P	19,64 (16,94; 27,02)	14,72 (11,85; 15,29)*	0
<i>S. aureus</i> 29213	19,07 (16,57; 20,63)	5,88 (4,25; 8,89)*	0
<i>P. mirabilis</i> 24a	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0
<i>C. albicans</i> 927	6,91 (5,78; 11,11)	0	0
Примечание: * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с триптоном			

Далее проведено исследование влияния различных источников углерода на противомикробную активность метаболитов (Таблицы 3, 4). Для этого к растворам триптона добавляли глюкозу, лактозу, мальтозу, крахмал и оценивали исследуемое свойство. Конечная концентрация углеводов в среде не превышала 1%, поскольку более высокие дозировки отрицательно сказывались на проявлении противомикробных свойств метаболитов.

Введение углеводов в питательную среду способствовало усилению противомикробной активности исследуемых метаболитов. Согласно данным таблицы 4, наибольший прирост активности метаболитов *B. subtilis* 3Н отмечен при добавлении глюкозы и мальтозы. Эти углеводы обеспечивали выраженную активность по отношению ко всем тест-штаммам, включая ранее отсутствующую активность против штамма *E. coli* ATCC 25922. В то же время другие углеводы, такие как лактоза и крахмал, демонстрировали менее выраженный эффект.

Противомикробная активность метаболитов, полученных при выращивании с данными углеводами, статистически значимо ниже, чем при использовании глюкозы и мальтозы.

Таблица 3 – Влияние углеводов на противомикробную активность метаболитов штаммов *B. subtilis* 3Н

Тест-штаммы	Противомикробная активность (%), Ме (Q1;Q3), n=8			
	глюкоза	лактоза	мальтоза	крахмал
<i>S. aureus</i> FDA 209P	34,06 (27,80;39,38)	16,11 (14,84;24,9)*	25,56 (23,15;34,74)	25,22 (19,01;26,37)*
<i>S. aureus</i> 29213	32,06 (26,58;35,05)	22,34 (17,11;24,62)*	29,64 (24,68;34,79)	23,91 (17,74;24,72)*
<i>P. mirabilis</i> 24a	16,69 (14,36;20,75)	10,58 (8,78;10,82)*	16,17 (10,57;19,84)	8,22 (7,23;12,02)*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14,16 (5,91;16,45)	0	7,49 (5,82;15,31)	0
<i>C. albicans</i> 927	30,20 (26,92;38,78)	14,76 (11,07;16,34)*	29,97 (21,25;32,15)	12,29 (10,44;14,31)*
Примечание: * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с глюкозой				

Из данных, представленных в таблице 5, следует, что добавление глюкозы в питательную среду значительно повышало противомикробную активность метаболитов *B. subtilis* 1719 по отношению ко всем тест-штаммам. Кроме того, наблюдалось появление активности против *P. mirabilis* 24a и *E. coli* ATCC 25922, которая ранее не была выявлена. Углеводы, такие как лактоза, мальтоза и крахмал, демонстрировали менее выраженный стимулирующий эффект. Противомикробная активность метаболитов, полученных на питательных средах с этими углеводами, была статистически значимо ниже по сравнению с активностью метаболитов, синтезированных на среде с глюкозой.

На основании полученных результатов глюкоза была включена в состав питательной среды.

Таблица 4 – Влияние углеводов на противомикробную активность метаболитов штаммов *B. subtilis* 1719

Тест-штаммы	Противомикробная активность (%), Ме (Q1;Q3), n=8			
	глюкоза	лактоза	мальтоза	крахмал
<i>S. aureus</i> FDA 209P	36,99 (34,82;41,11)	19,11 (18,08;26,18)*	26,11 (20,59;27,22)*	21,46 (17,38;25,45)*
<i>S. aureus</i> 29213	35,17 (29,67;38,12)	15,48 (14,79;20,92)*	14,19 (13,59;20,90)*	14,52 (12,85;20,07)*
<i>P. mirabilis</i> 24a	11,11 (8,93;15,09)	0	0	6,96 (4,72;8,17)*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,95 (11,31;16,86)	0	0	0
<i>C. albicans</i> 927	25,88 (23,51;32,25)	14,99 (12,97;23,24)*	16,66 (11,72;20,73)*	18,11 (13,35;19,82)*
Примечание: * p < 0,05 – достоверность различий по сравнению с глюкозой				

Добавление неорганических соединений осуществляли на основании анализа питательных сред, рекомендованных для культивирования бактерий рода *Bacillus*. Для обеспечения нормального энергетического обмена в клетках и поддержания биосинтетических процессов в состав среды вводили дигидроортофосфат калия (KH₂PO₄). В качестве необходимых микроэлементов, используемых для обеспечения роста и развития бактерий *B. subtilis*, добавлены следующие вещества: FeSO₄, MnSO₄, NaCl. Состав сконструированной питательной среды представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Состав сконструированной питательной среды для культивирования бактерий *B. subtilis* (3Н и 1719)

Компонент питательной среды	Масса (г/л)
Глюкоза безводная	10,0
Триптон	10,0
Калий фосфорнокислый 2-х замещенный 3-х водный	0,5
Железо сернокислое 7-ми водное	0,01
Марганец сернокислый 5-ти водный	0,03
Натрий хлористый	5,0
pH = 7-7,2	

После разработки рецептуры питательной среды представляло интерес сравнить противомикробную активность исследуемых метаболитов, полученных на сконструированной среде, с активностью метаболитов, синтезированных на стандартных средах, используемых для культивирования бактерий *B. subtilis* (Таблицы 6, 7)

Из данных, представленных в таблице 6, следует, что метаболиты *B. subtilis* 3Н, синтезированные при культивировании на сконструированной питательной среде, демонстрировали выраженную противомикробную активность в отношении всех тест-штаммов. Уровень активности этих метаболитов превышал показатели аналогов, полученных на средах №9, ВК-2, №5 и LB. При сравнении с метаболитами, полученными на среде Гаузе №2, установлено, что активность метаболитов на сконструированной питательной среде была достоверно выше в отношении штаммов *S. aureus* FDA 209P, *P. mirabilis* 24a, *C. albicans* 927. Однако для штаммов *S. aureus* 29213 и *E. coli* ATCC 25922 статистически значимых различий в противомикробной активности не выявлено.

Таблица 6 – Противомикробная активность метаболитов *B. subtilis* 3Н через 24 часа культивирования на разных питательных средах

ПС	Противомикробная активность (%), Ме (Q1;Q3), n=8				
	Тест-штаммы				
	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. mirabilis</i> 24a	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>C. albicans</i> 927
Новая	53,94 (49,23; 60,11)	47,49 (44,11; 54,91)	36,32 (31,52; 44,17)	41,25 (29,23; 43,97)	49,12 (44,31; 56,67)
Гаузе №2	31,70 (22,13; 44,75)*	31,77 (19,12; 47,25)	19,09 (16,23; 19,81)*	18,97 (16,60; 34,34)	14,88 (9,73; 37,05)*
N9	28,84 (26,21; 44,11)*	37,95 (25,11; 38,27)*	6,15 (4,37; 11,67)*	18,75 (16,61; 24,59)*	20,78 (17,22; 38,26)*
ВК-2	27,05 (24,61; 36,46)*	27,69 (19,60; 28,01)*	12,37 (12,28; 18,35)*	18,57 (12,04; 20,86)*	25,17 (16,03; 35,94)*
N5	25,78 (16,22; 26,95)*	34,26 (17,74; 36,13)*	7,77 (7,15; 8,44)*	6,87 (3,22; 12,27)*	15,71 (9,88; 21,82)*
LB	13,25 (8,62; 18,74)*	9,8 (6,67; 21,22)*	9,12 (7,33; 11,22)*	4,12 (1,98; 8,44)*	15,19 (14,22; 16,51)*
Примечание: * p < 0,05 – достоверность различий по сравнению с новой ПС					

Из данных, представленных в таблице 7, следует, что метаболиты *B. subtilis* 1719, полученные на сконструированной питательной среде, проявляли противомикробное действие по отношению ко всем тест-штаммам. При сравнении с метаболитами, полученными на средах №5 и LB, их активность была достоверно выше ко всем тест-штаммам. При культивировании на средах Гаузе №2 и №9 противомикробное действие в отношении грамотрицательных тест-штаммов не отличалась от активности метаболитов, синтезированных на сконструированной среде. Однако в отношении стафилококков и грибов активность была значимо ниже. При сравнении с метаболитами, полученными на среде ВК-2, противомикробное действие метаболитов, синтезированных на сконструированной

среде, было значимо выше по отношению к четырем из пяти тест-штаммов. Однако значимых различий в активности к штамму *P. mirabilis* 24a не выявлено.

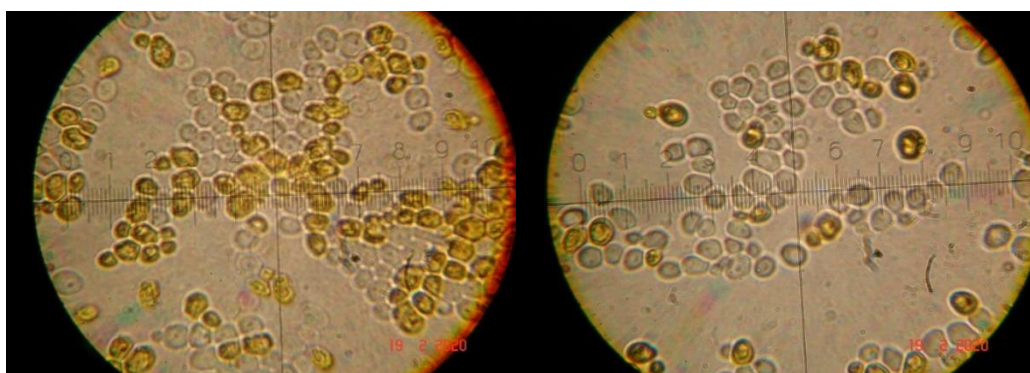
Таблица 7 – Противомикробная активность метаболитов *B. subtilis* 1719 через 24 часа культивирования на разных ПС

ПС	Противомикробная активность (%), Me (Q1;Q3), n=8				
	Тест-штаммы				
	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. mirabilis</i> 24a	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>C. albicans</i> 927
Новая	45,76 (42,03; 51,27)	44,94 (44,37; 52,19)	31,71 (22,91; 32,36)	27,25 (24,02; 30,17)	48,50 (43,39; 52,97)
Гаузе №2	26,22 (25,33; 35,50)*	34,22 (12,11; 38,37)*	17,52 (14,13; 25,05)	22,07 (21,66; 27,08)	25,17 (25,14; 32,91)*
N9	31,72 (24,18; 36,75)*	27,19 (24,07; 31,72)*	22,88 (20,86; 28,07)	18,97 (16,17; 24,11)	33,08 (32,15; 38,19)*
ВК-2	33,37 (27,19; 37,27)*	31,97 (18,37; 33,37)*	17,61 (15,72; 25,37)	17,37 (16,08; 21,91)*	22,17 (36,88; 30,67)*
N5	22,81 (15,58; 25,79)*	19,94 (16,23; 26,97)*	7,22 (7,19; 10,08)*	9,5 (8,77; 11,34)*	19,66 (17,74; 22,27)*
LB	16,01 (15,94; 20,14)*	14,84 (12,58; 15,10)*	3,37 (1,18; 4,19)*	2,25 (1,97; 2,79)*	15,94 (12,28; 16,24)*
Примечание: * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с новой ПС					

На рисунке 1 (А и Б) показаны результаты микроскопического исследования клеток тест-штамма *C. albicans* 927 под воздействием метаболитов *B. subtilis* 3Н, полученных при культивировании на новой питательной среде (опыт) и физиологическом растворе (контроль) соответственно. Клетки для микроскопии отбирали на этапе окрашивания раствором бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере (см. Главу 2, пп. 2.2.4.). При инкубации с физиологическим

раствором (контроль) часть клеток приобретала желтый оттенок, указывающий на присутствие в популяции клеток с поврежденной цитоплазматической мембраной. Однако инкубация с метаболитами существенно увеличивала количество "мертвых" клеток.

Результаты микроскопии подтвердили, что исследуемые метаболиты воздействуют на цитоплазматическую мембрану клеток, т.е. обладают цитотоксическим действием.



А

Б

Рисунок 1 – Микроскопия клеток *C. albicans* (увеличение микроскопа x1750): А – инкубация с физраствором (контроль); Б – инкубация с метаболитами *B. subtilis* ЗН. Желтые клетки – мертвые, неокрашенные – живые

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлено цитотоксическое действие метаболитов *B. subtilis* (ЗН и 1719) и сконструирована питательная среда, обеспечивающая синтез противомикробных соединений исследуемых бацилл.

3.1.2. Определение оптимального времени культивирования

Характер синтеза метаболитов в процессе жизнедеятельности является индивидуальным для каждого штамма-продуцента и зависит от условий его выращивания [58]. Известно, что бациллы обычно синтезируют антибиотические

соединения в логарифмической фазе роста, одновременно с накоплением биомассы [15, 25, 150]. Тем не менее, некоторые штаммы могут проявлять другие сроки продукции противомикробных метаболитов, синтез которых может происходить как в логарифмическую, так и в стационарную фазы роста [82, 87, 99, 113, 150, 166]. В связи с этим на следующем этапе исследования проведено изучение динамики роста штаммов *B. subtilis* (Рисунок 2).

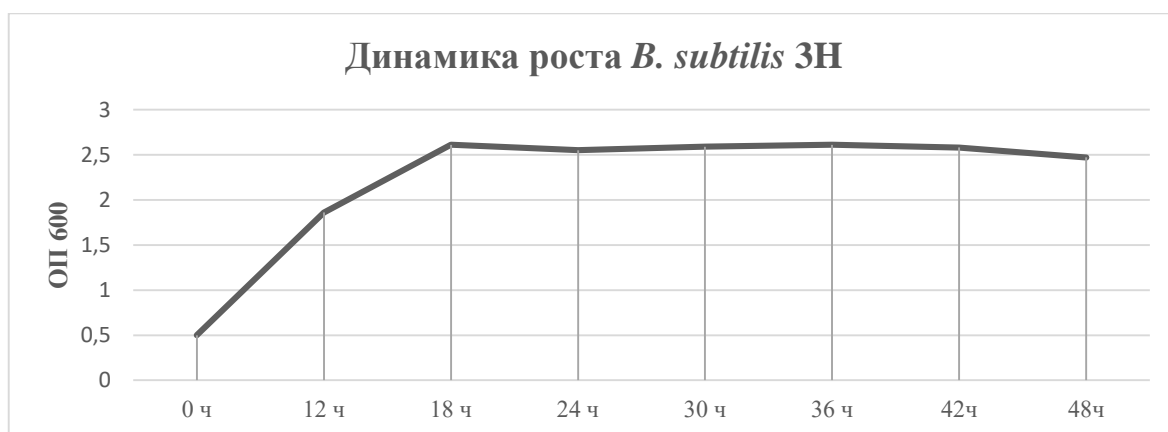
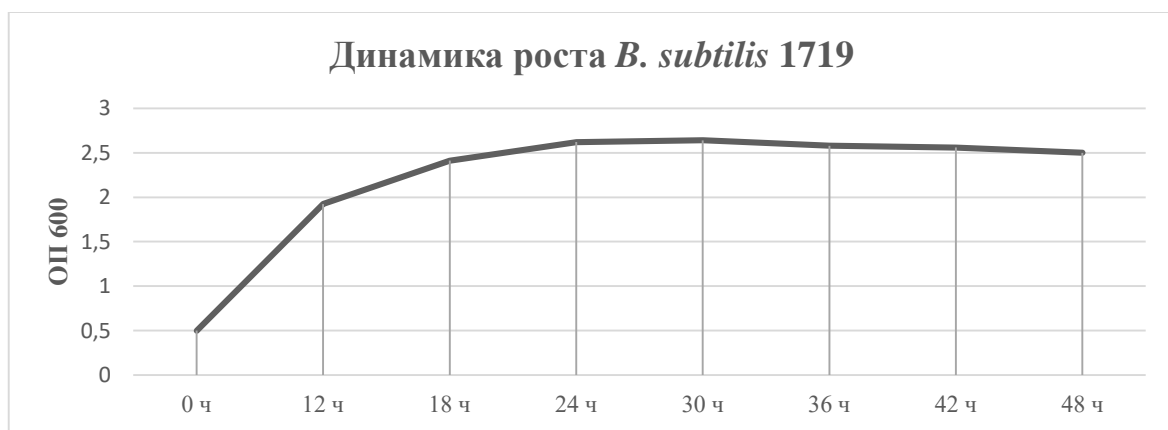
А**Б**

Рисунок 2 – Динамика роста штаммов *B. subtilis*: А – динамика роста *B. subtilis* 3Н; Б – динамика роста *B. subtilis* 1719

Из данных, представленных на рисунке 2, следует, что биомасса штамма *B. subtilis* 3Н увеличивалась в течение 18 часов. У штамма *B. subtilis* 1719 активный рост продолжался до 24 часов культивирования.

После измерений оптической плотности полученной биомассы, каждую пробу культуральной жидкости отделяли от клеток (см. Главу 2, пп. 2.2.3.) и изучали противомикробную активность содержащихся в них метаболитов (Таблицы 8, 9).

Из данных, представленных в таблице 8, следует, что противомикробные метаболиты *B. subtilis* 3Н начинали синтезироваться в логарифмической фазе роста культуры. Активность в отношении всех тест-штаммов возрастала до 30 часов культивирования, что подтверждается более высокими показателями по сравнению с ранними этапами (12, 18 и 24 часа). Отсутствие статистически значимых различий активности в интервале от 30 до 48 часов свидетельствует о стабилизации противомикробного действия, что делает дальнейшее увеличение времени культивирования неэффективным. Таким образом, оптимальным временем культивирования штамма *B. subtilis* 3Н для получения метаболитов с высокой противомикробной активностью является срок 30 часов.

Согласно данным, представленными в таблице 9, противомикробное действие метаболитов *B. subtilis* 1719 в отношении штамма *S. aureus* FDA 209P возрастало до 30 часов культивирования. После 36 часов выращивания активность снижалась, что подтверждается достоверными различиями между группами 4 и 7 (30 и 48 часов). Противомикробное действие метаболитов в отношении штаммов *S. aureus* 29213 и *P. mirabilis* 24а увеличивалось до 36 часов. Далее наблюдали снижение активности, о чем свидетельствуют значимые различия между группами 4 и 7 (30 и 48 часов), а также 5 и 7 (36 и 48 часов). Противомикробное действие метаболитов в отношении штамма *E. coli* ATCC 25922 возрастало до 36 часов и затем снижалось, что подтверждается значимыми различиями между группами 3-6 (24 и 36 часов) и 3-7 (24 и 48 часов). Активность против грибов *C. albicans* 927 также накапливалась до 36 часов, после чего происходило ее снижение, подтвержденное значимыми различиями между группами 4 и 6 (30 и 42 часа), и отсутствием различий между группами 5 и 6 (36 и 42 часа). Таким образом, оптимальным временем культивирования штамма *B. subtilis* 1719 для получения метаболитов с высокой противомикробной активностью является срок 36 часов.

Таблица 8 – Противомикробная активность метаболитов *B. subtilis* 3Н в зависимости от времени культивирования

Группы. Часы	Противомикробная активность метаболитов <i>B. subtilis</i> 3Н (%), Ме (Q1;Q3), n=8				
	Тест-штаммы				
	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. mirabilis</i> 24a	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> 927
1. 12	13,13 (8,34; 13,85)	13,91 (12,01; 19,24)	6,09 (4,53; 8,71)	0	19,07 (15,48; 19,77)
2. 18	49,01 (44,91; 51,20)	44,61 (43,27; 50,78)	16,78 (14,00; 20,71)	17,59 (17,49; 20,44)	45,28 (44,39; 51,27)
3. 24	55,87 (48,94; 59,61)	52,34 (45,66; 53,17)	36,87 (31,78; 38,21)	35,29 (33,34; 40,17)	52,78 (52,17; 54,11)
4. 30	58,72 (51,68; 63,05)	55,20 (47,37; 57,64)	40,08 (37,16; 48,24)	40,88 (37,16; 42,07)	61,38 (61,27; 70,18)
5. 36	60,81 (58,82; 68,07)	60,01 (59,68; 61,73)	46,12 (38,37; 46,21)	45,30 (40,54; 48,26)	67,34 (61,81; 70,80)
6. 42	64,11 (63,11; 74,37)	62,85 (58,29; 64,94)	49,24 (44,85; 52,45)	47,61 (44,28; 48,37)	68,15 (66,38; 72,06)
7. 48	68,37 (65,60; 72,31)	63,94 (61,28; 66,23)	48,28 (40,69; 50,31)	49,37 (42,14; 49,39)	73,54 (66,55; 75,41)
p < 0,05	p1-4 = 0,02 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 < 0,01 p2-5 = 0,04 p2-6 < 0,01 p2-7 < 0,01 p3-6 = 0,04 p3-7 = 0,02	p1-4 = 0,03 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 < 0,01 p2-5 = 0,03 p2-6 < 0,01 p2-7 < 0,01 p3-7 = 0,02 p4-7 = 0,04	p1-3 = 0,04 p1-4 < 0,01 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 < 0,01 p2-4 = 0,04 p2-5 = 0,02 p2-6 < 0,01 p2-7 < 0,01	p1-3 = 0,03 p1-4 < 0,01 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 < 0,01 p2-5 < 0,01 p2-6 < 0,01 p2-7 < 0,01	p1-4 < 0,01 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 < 0,01 p2-4 = 0,03 p2-5 = 0,02 p2-6 < 0,01 p2-7 < 0,01 p3-6 = 0,03 p3-7 = 0,02

Таблица 9 – Противомикробная активность метаболитов *B. subtilis* 1719 в зависимости от времени культивирования

Группы. Часы	Противомикробная активность метаболитов <i>B. subtilis</i> 1719 (%), Ме (Q1;Q3), n=8				
	Тест-штаммы				
	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. mirabilis</i> 24a	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> 927
1. 12	15,51 (14,54; 23,09)	27,69 (17,04; 28,65)	0	0	3,44 (2,14; 5,87)
2. 18	35,39 (30,51; 40,64)	39,47 (34,73; 42,81)	14,11 (12,18; 18,20)	13,15 (7,11; 17,71)	15,82 (14,86; 21,82)
3. 24	42,11 (40,92; 43,11)	46,61 (46,07; 48,18)	30,16 (26,13; 35,29)	28,33 (23,11; 29,63)	41,17 (34,70; 42,07)
4. 30	56,80 (54,72; 64,77)	51,08 (48,23; 56,97)	43,42 (38,48; 47,12)	40,47 (39,83; 45,04)	46,87 (46,05; 57,94)
5. 36	53,13 (47,78; 55,52)	50,63 (45,41; 56,01)	48,84 (47,22; 51,32)	40,28 (40,11; 48,97)	49,22 (42,07; 51,49)
6. 42	45,57 (43,03; 51,87)	43,67 (43,28; 50,66)	53,58 (45,33; 53,95)	46,30 (43,08; 53,79)	47,41 (41,85; 52,17)
7. 48	42,13 (39,81; 45,11)	39,80 (35,69; 40,42)	50,54 (45,12; 53,74)	43,79 (41,57; 51,08)	35,99 (30,55; 44,94)
p < 0,05	p1-3 = 0,04 p1-4 < 0,01 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 = 0,05 p2-4 < 0,01 p2-5 < 0,01 p3-4 = 0,02 p4-7 = 0,02	p1-3 < 0,01 p1-4 < 0,01 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p2-4 < 0,01 p2-5 = 0,03 p4-7 = 0,02 p5-7 = 0,04	p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 < 0,01 p2-4 = 0,04 p2-5 < 0,01 p2-6 < 0,01 p2-7 < 0,01 p3-5 = 0,03 p3-6 = 0,03 p3-7 = 0,04	p1-4 < 0,01 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 < 0,01 p2-4 = 0,02 p2-5 < 0,01 p2-6 < 0,01 p2-7 < 0,01 p3-6 = 0,02 p3-7 = 0,03	p1-3 = 0,02 p1-4 < 0,01 p1-5 < 0,01 p1-6 < 0,01 p1-7 = 0,03 p2-4 < 0,01 p2-5 < 0,01 p2-6 < 0,01

В результате проведенных экспериментов определены оптимальные сроки культивирования штаммов *B. subtilis*, при которых достигается максимальный выход противомикробных метаболитов. Полученные данные учитывали при дальнейшем изучении биологических свойств метаболитов, обуславливающих их пробиотическое действие.

3.2. Исследование биологической активности метаболитов

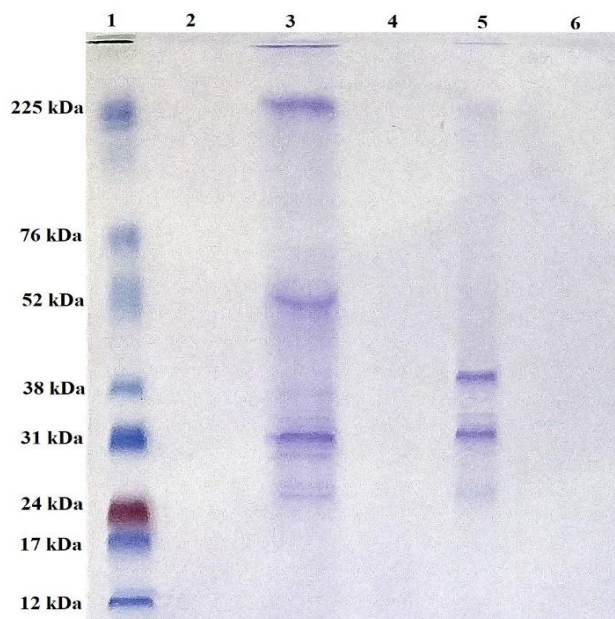
***Bacillus subtilis* в опытах in vitro**

3.2.1. Исследование антимикробной активности фракций метаболитов

Из научной литературы известно, что механизмы антагонистической активности *B. subtilis* имеют штаммоспецифичный характер. Каждый штамм сенной палочки синтезирует индивидуальный набор биологически активных веществ, обеспечивающих их функциональные свойства. Антагонистическая активность является ключевым показателем, определяющим эффективность пробиотического продукта. В связи с этим после оптимизации условий культивирования штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) представляло интерес исследовать микростатическое действие (см. Главу 2, пп. 2.2.4.) их метаболитов в дополнение к анализу цитотоксической активности, а также определить молекулярную массу действующего вещества.

Ранее в ходе изучения ферментативных свойств штамма *B. subtilis* 3Н было предположено, что антагонистическая активность данной культуры обусловлена продукцией литических ферментов [52]. Исходя из этого представлялось важным исследовать влияние белковой фракции метаболитов на проявление противомикробной активности.

Для осаждения белковой фракции к нативным метаболитам вносили 10%-ный раствор ТХУ (см. Главу 2, пп. 2.2.7.). На рисунке 3 представлены результаты электрофореза питательной среды, нативных метаболитов и метаболитов после обработки ТХУ.



Примечания: 1 – белковый маркер Cytiva RPN756E (12 – 225 kDa); 2 – НПС; 3 – метаболиты *B. subtilis* 3Н; 4 – метаболиты *B. subtilis* 3Н после добавления ТХУ; 5 – метаболиты *B. subtilis* 1719; 6 – метаболиты *B. subtilis* 1719 после добавления ТХУ.

Рисунок 3 – Данные электрофореза метаболитов *B. subtilis*

Электрофорез проводили по описанной методике (см. Главу 2, пп. 2.2.8.). Из представленных данных на рисунке 3 видно, что в питательной среде отсутствовали белковые молекулы. При этом в составе метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н выявлены белки массой 31, 52 и 225 кДа. В составе метаболитов *B. subtilis* 1719 – 31 и 38 кДа. Добавление ТХУ привело к осаждению белков в составе метаболитов исследуемых штаммов.

Одновременно нативные метаболиты подвергали ультрафильтрации с использованием центрифужных концентраторов, оснащенных мембранами с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 и 5 кДа. Полученные фракции исследовали на способность задерживать рост тест-штаммов (Таблицы 10, 11).

Из представленных данных в таблицах 10 и 11 следует, что исследуемые метаболиты проявляли выраженный микростатический эффект в отношении тест-штаммов. Осажденный белковый концентрат не обладал данным свойством. Противомикробная активность проявлялась во фракции с молекулярной массой менее 5 кДа, при этом ее уровень соответствовал активности нативных метаболитов, что подтверждается отсутствием статистически значимых различий.

Во фракциях с молекулярной массой более 5 кДа противомикробное действие отсутствовало.

Таблица 10 – Микробостатическое действие метаболитов *B. subtilis* 3Н и их молекулярных фракций

Тест-штаммы	Задержка роста тест-штаммов (мм), Ме (Q1;Q3), n=10				
	нативные метаболиты	белок	>30 кДа	< 30 кДа, но > 5 кДа	< 5 кДа
<i>S. aureus</i> FDA 209P	24,00 (21,25;27,87)	0	0	0	25,75 (21,25;28,25)
<i>S. aureus</i> 29213	20,00 (17,25;25,25)	0	0	0	20,00 (16,12;22,75)
<i>P. mirabilis</i> 24a	13,00 (12,12;14,00)	0	0	0	13,75 (11,25;17,25)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,75 (12,12;15,75)	0	0	0	14,00 (11,25;17,25)
<i>C. albicans</i> 927	20,25 (18,00;24,75)	0	0	0	19,00 (17,00;21,00)

Таблица 11 – Микробостатическое действие метаболитов *B. subtilis* 1719 и их молекулярных фракций

Тест-штаммы	Задержка роста тест-штаммов (мм), Ме (Q1;Q3), n=10				
	нативные метаболиты	белок	>30 кДа	< 30 кДа, но > 5 кДа	< 5 кДа
<i>S. aureus</i> FDA 209P	20,50 (18,25;24,50)	0	0	0	21,00 (19,00;25,00)
<i>S. aureus</i> 29213	18,00 (15,50;25,00)	0	0	0	20,50 (13,50;21,00)
<i>P. mirabilis</i> 24a	19,25 (16,50;23,25)	0	0	0	18,50 (16,25;22,25)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,00 (11,00;13,00)	0	0	0	13,00 (10,5;14,00)
<i>C. albicans</i> 927	17,50 (15,25;19,25)	0	0	0	18,00 (14,50;20,00)

Таким образом установлено, что метаболиты штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) обладают микростатическим эффектом, проявляющийся в ингибировании роста тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Противомикробные соединения, синтезируемые исследуемыми бактериями, относятся к низкомолекулярным веществам с молекулярной массой менее 5 кДа. Белковые компоненты, обнаруженные в составе метаболитов, не участвуют в реализации антагонистических свойств.

3.2.2. Исследования состава низкомолекулярной фракции метаболитов

Для идентификации метаболитов, обладающих противомикробными свойствами, проводили ВЭЖХ-МС анализ (см. Главу 2, пп. 2.2.10.). Этот метод является одним из наиболее высокоточных и высокотехнологичных инструментов, обеспечивающих детектирование, идентификацию и количественный анализ биологически активных веществ.

Ранее нами установлено, что противомикробная активность метаболитов *B. subtilis* локализуется во фракции с молекулярной массой менее 5 кДа. На основании этих данных внимание было сосредоточено на низкомолекулярных соединениях, которые секретируются в культуральную жидкость в процессе выращивания штаммов *B. subtilis* и отсутствуют в нативной питательной среде (контроль). Для анализа метаболитов отбирались пробы на разных стадиях культивирования (8, 24, 30 и 48 часов), что позволило отследить динамику образования биологически активных веществ.

В результате проведенного исследования выявлено более 300 низкомолекулярных соединений. На рисунке 4 представлены хроматограммы идентифицированных веществ. Среди них особый интерес вызвали 23 соединения, которые накапливались в культуральной жидкости в процессе роста штамма *B. subtilis* 3Н (Таблица 12). Из них удалось идентифицировать 11, включая два антибиотика: Мусинамицин VI – макролидный антибиотик, действующий в отношении грамположительных бактерий [199] и Laurenobiolide – вещество,

активное в отношении золотистого стафилококка [194]. Остальные вещества представляют интерес и открывают перспективы для дальнейшего изучения их химической структуры и биологической активности.

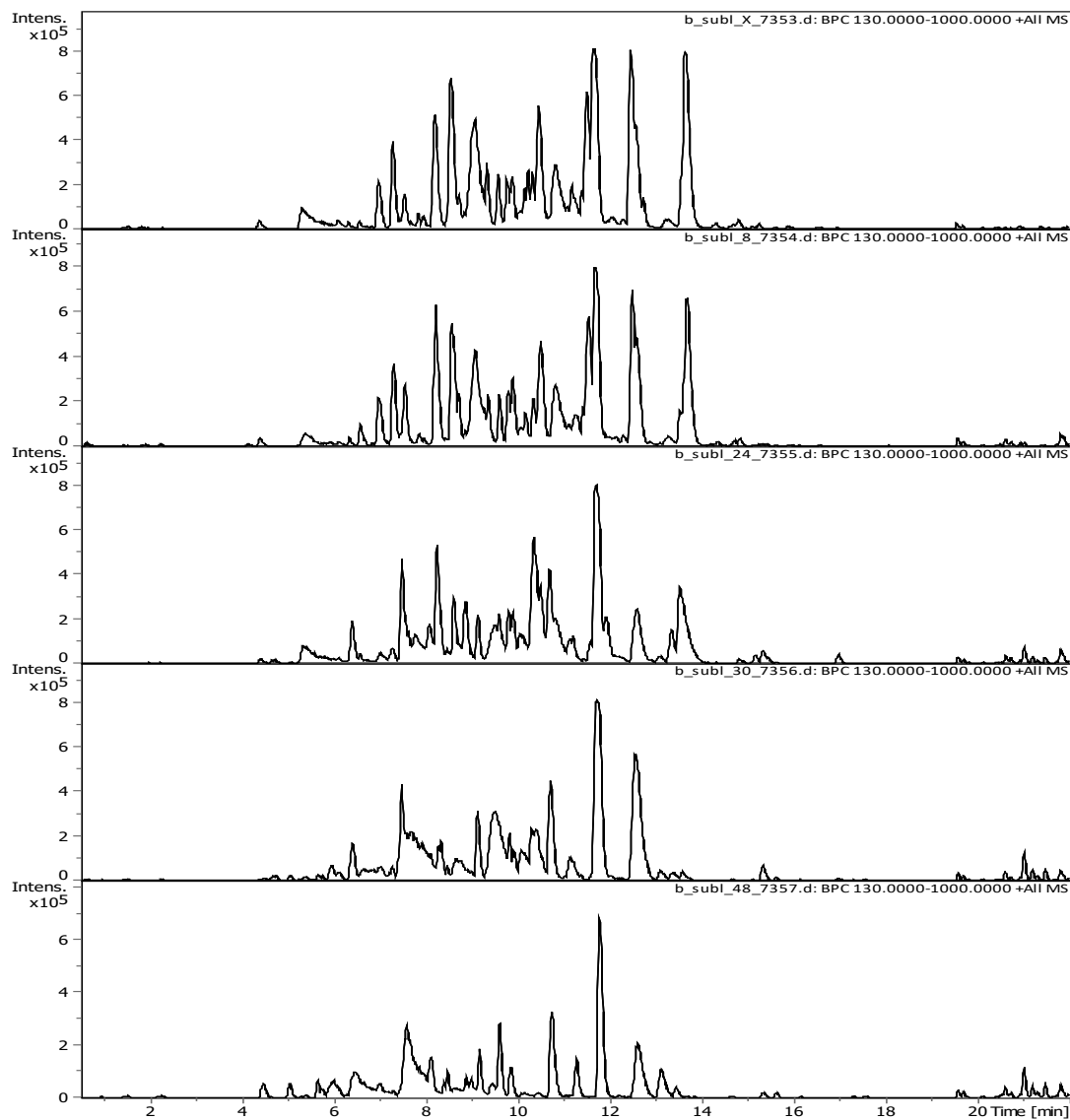


Рисунок 4 – Хроматограммы по наиболее интенсивному иону для НПС и метаболитов *B. subtilis* 3H в разные времена культивирования

Таблица 12 – Низкомолекулярные вещества, идентифицированные в составе метаболитов *B. subtilis*

№	Название вещества	Молекулярная масса (Да)	Абс. интегральная интенсивность сигнала				
			НПС	8 ч роста	24 ч роста	30 ч роста	48 ч роста
1	Mycinamicin VI (C ₃₅ H ₅₇ NO ₁₁)	667,3912	0	0	15135	39685	38252
2	Laurenobiolide (C ₁₇ H ₂₂ O ₄)	290,1520	0	238	3428	8722	15131
3	Lapachenole (C ₁₆ H ₁₆ O ₂)	240,1149	0	6182	8616	5099	5986
4	D-erythro-Sphingosine C-17 (C ₁₇ H ₃₅ NO ₂)	285,2671	0	6505	30297	51359	51958
6	Prosolanapyrone II (C ₁₈ H ₂₄ O ₄)	304,16727	0	57146	65544	47921	50992
7	2,2-Dimethyl-8-prenylchromene 6-carboxylic acid (C ₁₇ H ₂₀ O ₃)	272,14112	0	11343	14942	10729	11462
8	(4-{4-[2-(gamma-L-Glutamylamino)ethyl]phenoxy}methyl}furan-2-yl)methanamine (C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₅)	375,1793	2030	2710	7698	23222	56594
9	Pro Leu Tyr (C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₅)	391,2113	0	905	12736	18113	7158
10	Ile Phe (C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃)	278,1637	0	4201	9185	1203	3684
11	Pro Phe Pro (C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₄)	359,1849	0	928	6202	22527	43342
12	–	633,3502	0	1609	8332	22355	5706
13	–	651,3597	0	3989	18701	53846	12354
14	–	653,3748	0	339	11922	10280	9670
15	–	741,3917	1018	3712	6074	5182	30930
16	–	541,2556	393	961	17996	10224	16213
17	–	559,2653	1413	7344	178720	123301	153327
18	–	625,3801	0	529	22189	24763	15445
19	–	369,2265	0	0	5890	6780	9394
20	–	502,2470	0	663	8512	12205	11663
21	–	571,3388	0	1308	234639	561602	206043
22	–	599,3322	0	201	4643	7084	7555
23	–	322,1393	0	9210	14901	13591	14320

3.2.3. Исследование ферментативной активности метаболитов

Индигенная микробиота человека играет ключевую роль в процессах пищеварения. В результате переработки экзогенных (пищевых) и эндогенных субстратов, образуются низкомолекулярные питательные, регуляторные и сигнальные молекулы, необходимые для жизнедеятельности организма хозяина [161, 158]. Нарушения в составе и функциях микробиоты, известные как дисбиотические изменения, лежат в основе многочисленных патологий, включая дисфункции пищеварительного тракта. Бактерии *B. subtilis*, являясь транзиторными обитателями желудочно-кишечного тракта, способны улучшать деятельность желудочно-кишечного тракта посредством продукции гидролитических ферментов.

Ранее было показано, что штаммы *B. subtilis* (3Н и 1719) способны проявлять протеолитические и амилолитические свойства [20, 51, 52, 64]. На основании данных электрофореза исследуемых метаболитов (Рисунок 3) можно предположить, что выявленные белковые молекулы представляют собой гидролитические ферменты. Для проверки этого предположения проведены исследования ферментативной активности (далее – ФА) метаболитов, а также их молекулярных фракций (Таблица 13). Ферментативные свойства оценивали по способности метаболитов гидролизовать казеин и крахмал (см. Главу 2, пп. 2.2.5.).

Из данных, представленных в таблице 13, можно сделать вывод, что исследуемые метаболиты обладают выраженными протеолитическими и амилолитическими свойствами. Это подтверждается наличием зон гидролиза вокруг лунок на чашках Петри, содержащих молочный и картофельный агар.

Анализ ферментативной активности показал, что активные компоненты метаболитов сосредоточены во фракции с молекулярной массой более 30 кДа. В низкомолекулярных фракциях (менее 30 кДа) ферментативная активность отсутствует.

Таблица 13 – Ферментативная активность метаболитов *B. subtilis* и их молекулярных фракций

Фракции	Зоны гидролиза казеина (мм), Me (Q1;Q3), n=10		Зоны гидролиза крахмала (мм), Me (Q1;Q3), n=10	
	Метаболиты			
	<i>B. subtilis</i> 3Н	<i>B. subtilis</i> 1719	<i>B. subtilis</i> 3Н	<i>B. subtilis</i> 1719
Нативные метаболиты	26,75 (25,25;29,50)	28,00 (23,50;29,75)	21,00 (18,75;25,50)	24,5 (21,50;28,75)
>30 кДа	33,00 (28,75;36,50)	34,5 (29,75;37,50)	28,00 (24,50;30,00)	30,75 (27,50;33,50)
< 30 кДа, но > 5 кДа	0	0	0	0
< 5 кДа	0	0	0	0

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что метаболиты *B. subtilis* (3Н и 1719) обладают высокими протеолитическими и амилолитическими свойствами, которые обусловлены гидролитическими ферментами. Эти выводы подтверждаются данными фракционирования по молекулярной массе, а также результаты электрофореза, выявившими наличие высокомолекулярных белков в составе метаболитов.

3.2.4. Изучение влияния метаболитов на биопленкообразование условно-патогенных бактерий

В настоящее время достоверно установлено, что не только высшие животные и человек, но и ряд более простых организмов, включая одноклеточные, обладают способностью к различным формам коллективного взаимодействия, обмену информацией и формированию ассоциаций из множества индивидов. Одним из ярких примеров такого поведения является социальное поведение бактерий, которое лежит в основе образования специфически организованных биопленок, формирование которых происходит за счет синтеза микроорганизмами экзополисахаридов [26]. Эти вещества образуют вокруг микробных ассоциаций

внеклеточный матрикс, который адгезируется на различных поверхностях. Биопленки обеспечивают оптимальные условия для персистенции бактерий как в окружающей среде, так и в организме хозяина.

Формирование структурированных микробных сообществ представляет собой серьезную проблему в здравоохранении, поскольку бактерии в составе биопленок обладают повышенной устойчивостью к эффекторам иммунной системы, дезинфектантам и антибиотикам [26].

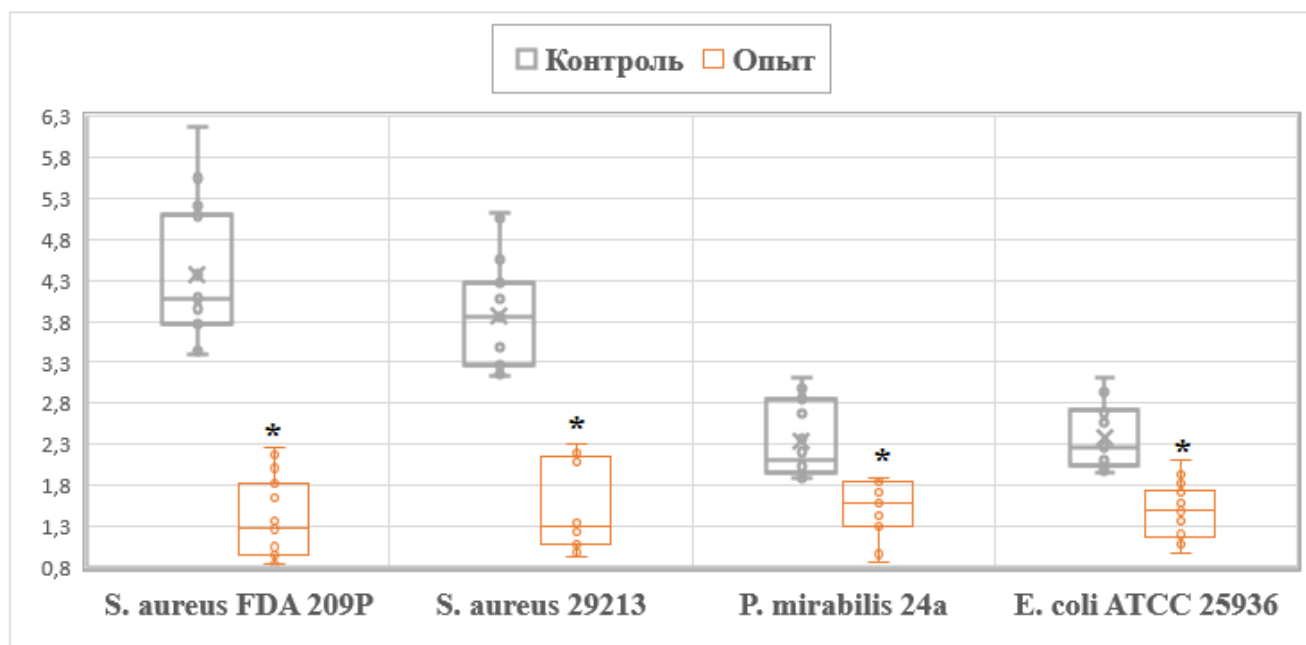
Известно, что бактерии *B. subtilis* могут продуцировать ферменты класса лиаз [59], которые способны расщеплять экзополисахариды матрикса биопленок. Такие ферменты обладают значительным потенциалом в борьбе с устойчивыми микробными сообществами. Кроме того, ингибирующее действие пробиотических продуктов на процессы биопленкообразования болезнетворных бактерий представляет собой дополнительный аспект их антагонистической активности. Этот эффект значительно расширяет спектр возможностей применения пробиотических продуктов, предлагая их в качестве альтернативного или вспомогательного средства в антимикробной терапии. В связи с этим представляло интерес исследовать влияния метаболитов штаммов *B. subtilis* (ЗН и 1719) на биопленкообразование тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов.

Биопленкообразование изучали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного полистеролового стерильного планшета (см. Главу 2, пп. 2.2.6.). Результаты влияния исследуемых метаболитов на биопленкообразования тест-штаммов представлены на рисунках 5 и 6.

При проведении контроля чистых культур медианное значение коэффициента БПО у тест-штаммов составило: для *S. aureus* FDA 209P – 4,08 (3,81; 5,10) ед., для *S. aureus* 29213 – 3,85 (3,28; 4,27) ед., для *P. mirabilis* 24a – 2,11 (1,96; 2,77) ед., для *E. coli* ATCC 25922 – 2,27 (2,04; 2,64) ед.

Из данных, представленных на рисунке 5, видно, что воздействие метаболитов штамма *B. subtilis* ЗН приводило к снижению БПО у всех исследованных тест-штаммов. Так, у *S. aureus* FDA 209P коэффициент БПО уменьшался с 4,08 (3,81;

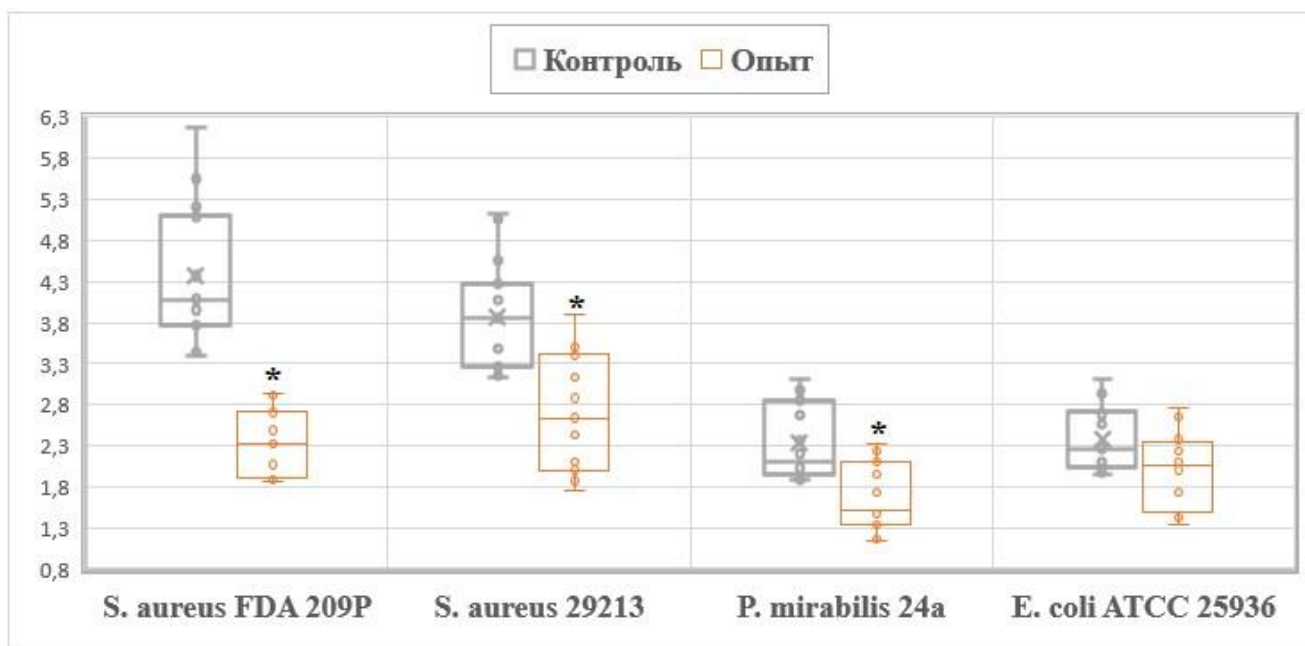
5,10) ед. до 1,27 (1,00; 1,74) ед., что свидетельствует о выраженном ингибирующем эффекте метаболитов. Аналогичные изменения наблюдали у *S. aureus* 29213, где медианное значение коэффициента БПО снизилось с 3,85 (3,28; 4,27) ед. до 1,29 (1,12; 2,12) ед. Для грамотрицательных тест-штаммов также отмечено снижения уровня БПО. У *P. mirabilis* 24а уменьшался с 2,11 (1,96; 2,77) ед., до 1,59 (1,32; 1,78) ед., а у *E. coli* ATCC 25922 с 2,27 (2,04; 2,64) ед. до 1,51 (1,29; 1,73) ед.



Примечание: n=15; * p < 0,05 — достоверность различий по сравнению с контролем

Рисунок 5 – Влияние метаболитов *B. subtilis* 3H на биопленкообразование тест-штаммов

Согласно данным, представленным на рисунке б, воздействие метаболитов штамма *B. subtilis* 1719 приводило к снижению коэффициента БПО у *S. aureus* FDA 209P с 4,08 (3,81; 5,10) ед. до 2,33 (1,92; 2,63) ед., у *S. aureus* 29213 с 3,85 (3,28; 4,27) ед. до 2,64 (2,06; 3,27) ед. и у *P. mirabilis* 24а с 2,11 (1,96; 2,77) ед., до 1,52 (1,36; 2,03) ед. При этом достоверные различия между опытными и контрольными пробами *E. coli* ATCC 25922 не выявлены, что может свидетельствовать об отсутствии существенного влияния метаболитов *B. subtilis* 1719 на БПО данного штамма.



Примечание: n=15; * $p < 0,05$ — достоверность различий по сравнению с контролем

Рисунок 6 – Влияние метаболитов *B. subtilis* 1719 на био пленкообразование тест-штаммов

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлена способность метаболитов штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) ингибировать процесс формирования биопленок условно-патогенных микроорганизмов. Полученные данные указывают на потенциальный вклад данного механизма в реализацию пробиотических свойств сенной палочки и расширяют перспективы использования исследуемых метаболитов.

3.2.5. Определение цитокиноподобных веществ в составе метаболитов

Бактерии *B. subtilis* известны своим положительным влиянием на иммунную систему человека. В ряде исследований продемонстрирована их способность усиливать как неспецифический, так и специфический иммунный ответ. Введение клеток сенной палочки стимулирует активацию макрофагов, что сопровождается усилением синтеза и высвобождения провоспалительных цитокинов. Этот процесс приводит к развитию комплексного воспалительного ответа, направленного на уничтожение патогенов. Кроме того, бактерии *B. subtilis* способствуют активации

и пролиферации Т- и В- лимфоцитов, что обусловлено как прямым действием пептидогликанов и тейхоевых кислот, так и усиленным высвобождением цитокинов макрофагами [94]. Однако механизмы, посредством которых сенная палочка активирует макрофаги, продолжают оставаться предметом научного изучения.

В научной литературе обсуждается вопрос о способности бактерий продуцировать цитокины (ЦПВ) [42]. В ряде исследований показано их наличие в культуральных супернатантах некоторых условно-патогенных бактерий: стафилококки, энтерококки, эшерихии и др [6]. Учитывая, что *B. subtilis* являются мощными продуцентами различных биологически активных веществ, можно предположить, что их иммуностимулирующее действие частично обусловлено синтезом ЦПВ. Исходя из вышеизложенного, целью следующего этапа нашей работы стало исследование метаболитов штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) на наличие в них ЦПВ при помощи метода проточной цитометрии (см. Главу 2, пп. 2.2.9.).

Из полученных данных, представленных в таблице 14, следует, что в составе исследуемых метаболитов определяются вещества, подобные цитокинам. При этом наличие и концентрация выявленных ЦПВ зависели от штамма сенной палочки. Самым активным продуцентом оказался штамм *B. subtilis* 1719, в метаболитах которого идентифицировали IL-1 β в относительно высокой концентрации (1741,25 пкг/мл), IL-1 α (109,55 пкг/мл), IL-31 (52,07 пкг/мл), IL-13 (28,24 пкг/мл) и IL-33 (5,73 пкг/мл). Культура *B. subtilis* 3Н также синтезировала IL-1 β и IL-31. Однако концентрация IL-1 β по сравнению с метаболитами штамма *B. subtilis* 1719 была ниже в 9,3 раза (186,43 пкг/мл). При этом у штамма *B. subtilis* 3Н определено наличие IL-8 (6,74 пкг/мл), отсутствующего в составе метаболитов *B. subtilis* 1719.

Поскольку все идентифицированные вещества относятся к провосполительным цитокинам, можно предположить, что именно их продукция обеспечивает иммуностимулирующее действие сенной палочки. Ранее, при изучении влияния клеток штамма *B. subtilis* 1719 на показатели иммунитета в опытах *in vivo*, было установлено, что однократное пероральное введение культуры приводило к увеличению цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ в

сыворотке крови лабораторных животных. При этом наиболее значимо возросло количество IL-1 β [20]. Эти данные, на наш взгляд, хорошо коррелируют с полученными результатами эксперимента и подтверждают биологическую активность ЦПВ сенной палочки.

Таблица 14 – Концентрация ЦПВ в метаболитах *B. subtilis*

Цитокины	Концентрация (пкг/мл), Me (Q1;Q3), n=5		
	<i>B. subtilis</i> 3Н	<i>B. subtilis</i> 1719	НПС
IL-8	6,74 (4,96;7,23)	0	0
MIP-1 β	0	0	0
IL-4	0	0	0
TNF α	0	0	0
IP-10	0	0	0
IL-17A	0	0	0
IL-13	0	28,24 (20,42;36,06)	0
MCP-1	0	0	0
IL-27	0	0	0
IL-31	39,36 (32,7;45,96)	52,07 (46,55;57,58)	0
IL-33	0	5,73 (4,59; 6,86)	0
IL-1β	186,43 (138,27;234,59)	1741,25 (1647,00;1835,49)	0
IL-10	0	0	0
IL-6	0	0	0
IL-1α	0	109,55 (101,04; 112,61)	0
IFN γ	0	0	0
MIP-1 α	0	0	0

В результате проведенного эксперимента установлено, что исследуемые бактерии *B. subtilis* (3Н и 1719) в процессе роста продуцируют штаммоспецифические вещества, подобные цитокинам. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего изучения ЦПВ, синтезируемых *B. subtilis*. Особый интерес представляет сравнение их структуры и свойств с

цитокинами макроорганизма и с ЦПВ условно-патогенных бактерий, а также исследования возможностей их практического применения.

3.2.6. Определение условий сохранения биологической активности метаболитов

Оценка стабильности биологической активности метаболитов исследуемых штаммов является необходимым условием при разработке новых лекарственных препаратов на их основе. В рамках эксперимента метаболиты штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719), полученные из трех независимых культивирований, хранили при температурах +5 °С, -18 °С и в лиофилизированном виде в течение одного года. Через 1, 6 и 12 месяцев из каждой серии доставали по две аликвоты для оценки их противомикробной и ферментативной активности (Таблицы 15, 16).

Из представленных данных в таблицах 15 и 16 следует, что хранение метаболитов при температуре 5 °С в течение одного месяца приводило к снижению их биологических свойств, что подтверждается уменьшением показателей противомикробной и ферментативной активности по сравнению с исходными значениями. Хранение метаболитов при температуре -18 °С способствовало сохранению ферментативных свойств, однако противомикробная активность снижалась при длительном хранении (6 месяцев). При хранении метаболитов в лиофилизированном виде биологические свойства полностью сохранялись на протяжении всего срока наблюдения (12 месяцев). Статистически значимых различий в показателях активности метаболитов, измеренных на 1, 6 и 12 месяцах хранения, по сравнению с исходными значениями не выявлено.

В результате проведенного исследования определены оптимальные условия хранения метаболитов исследуемых штаммов, обеспечивающие стабильность их биологической активности. Наиболее эффективным методом оказалось лиофильное высушивание.

Таблица 15 – Биологическая активность метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н при различных условиях хранения

	ПА (%), Ме (Q1;Q3), n=6			ФА (мм), Ме (Q1;Q3), n=6	
	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> 927	Зоны гидролиза казеина	Зоны гидролиза крахмала
Контроль (1 день)	56,43 (52,23;63,11)	31,91 (25,12;34,16)	59,07 (54,45;63,04)	25,75 (24,25;27,62)	23,25 (21,75;24,00)
+5 °С (1 месяц)	38,12 (25,61;41,12)	14,39 (7,52;15,16)	24,76 (21,58;28,37)	21,00 (19,87;22,50)*	17,75 (13,37;18,75)*
-18 °С (1 месяц)	58,34 (51,21;62,17)	29,37 (24,54;33,06)	56,15 (49,36;61,94)	26,75 (25,00;27,37)	24,25 (20,25;24,87)
-18 °С (6 месяцев)	54,44 (47,59;58,43)	24,60 (17,18;28,31)	50,98 (41,54; 52,37)	24,50 (21,50;28,50)	22,75 (19,25;23,50)
-18 °С (12 месяцев)	49,41 (41,26;55,34)	26,05 (17,23;29,07)	47,86 (40,51;56,37)	26,00 (20,00;28,25)	19,00 (18,00;23,62)
Лиофилизация (1 месяцев)	54,75 (50,39;61,55)	32,96 (26,04;35,88)	57,08 (53,09;62,66)	23,50 (21,00;27,87)	25,50 (24,00;25,75)
Лиофилизация (6 месяцев)	57,69 (51,34;63,55)	27,34 (21,75;35,01)	56,71 (51,24;60,37)	22,50 (21,75;23,62)	23,75 (22,25;24,50)
Лиофилизация (12 месяцев)	55,23 (48,18;61,25)	28,89 (21,37;33,58)	55,03 (51,17;64,20)	23,50 (22,00;26,50)	21,50 (18,62;23,12)
* $p < 0,05$ — достоверность различий по сравнению с контролем					

Таблица 16 – Биологическая активность метаболитов штамма *B. subtilis* 1719 при различных условиях хранения

	ПА (%), Ме (Q1;Q3), n=6			ФА (мм), Ме (Q1;Q3), n=6	
	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> 927	Зоны гидролиза казеина	Зоны гидролиза крахмала
Контроль (1 день)	54,78 (50,53;59,41)	40,28 (40,11; 48,97)	49,22 (42,07; 51,49)	24,75 (21,75;28,87)	25,00 (19,12;29,37)
5 °С (1 месяц)	28,63 (22,12;30,76)*	24,46 (22,73;29,02)*	21,91 (20,44;29,12)*	16,50 (13,37;17,75)*	17,00 (16,25;18,73)*
-18 °С (1 месяц)	50,86 (47,34; 54,27)	42,21 (38,78; 44,90)	40,21 (37,01;44,14)	22,50 (20,50;23,75)	24,50 (20,25;26,25)
-18 °С (6 месяцев)	47,79 (45,35;53,02)	34,51 (30,29;38,92)*	37,82 (29,94;38,50)*	22,50 (19,75;23,37)	23,50 (20,00;27,50)
-18 °С (12 месяцев)	36,11 (32,53;40,13)*	25,46 (20,84;26,13)*	28,06 (21,15;30,72)*	20,50 (19,75;21,62)	23,00 (18,00;26,25)
Лиофилизация (1 месяцев)	56,60 (52,55;61,07)	45,34 (39,71;47,22)	44,41 (43,02;52,18)	26,50 (22,25;29,25)	25,00 (20,75;28,50)
Лиофилизация (6 месяцев)	52,12 (49,92;57,20)	43,82 (40,78;49,12)	46,13 (41,59;50,06)	24,00 (23,00;28,62)	24,25 (19,62;28,50)
Лиофилизация (12 месяцев)	54,78 (50,53;59,41)	40,28 (40,11; 48,97)	49,22 (42,07; 51,49)	24,75 (21,75;28,87)	25,00 (19,12;29,37)
* p < 0,05 — достоверность различий по сравнению с контролем					

Таким образом, исследования биологических свойств метаболитов штаммов *B. subtilis* (ЗН и 1719) в экспериментах *in vitro* выявили наличие в их составе низкомолекулярных противомикробных соединений (<5 кДа), протеолитических и амилолитических ферментов, цитокиноподобных веществ. Антагонистическая активность исследуемых метаболитов заключается в их цитотоксическом и микростатическом действии, а также в способности ингибировать формирование биопленок условно-патогенными бактериями.

Полученные данные позволили перейти к дальнейшим исследованиям, направленных на изучение биологической активности метаболитов в экспериментах *in vivo*.

3.3. Исследование безвредности и биологической активности метаболитов *Bacillus subtilis* в опытах *in vivo*

3.3.1. Изучение безвредности метаболитов

Важным показателем при разработке новых лекарственных средств является их безопасность для организма млекопитающих. Благодаря многолетним исследованиям установлено, что бактерии *B. subtilis* являются безвредными для человека. Присвоенный в FDA (США) статус GRAS допускает использование этих бактерий и их метаболитов в производстве лекарственных препаратов [20, 158].

Ранее установлено, что штамм *B. subtilis* ЗН является безопасным. Это подтверждено при его клиническом применении в качестве активного компонента пробиотика "Бактиспорин" [48, 64]. Результаты проведенных экспериментов по исследованию безопасности штамма *B. subtilis* 1719 на лабораторных животных свидетельствуют о том, что он является безвредным, не токсичным и авирулентным [19, 20]. Тем не менее, контроль испытуемых препаратов по показателю «Безвредность» является обязательным условием при отработке новых технологий производства пробиотических средств. Исходя из этого, на следующем этапе работы проведено изучение безвредности метаболитов штаммов *B. subtilis*

(3Н и 1719) (Таблица 17). Изучение безвредности проводили в соответствии с методическими рекомендациями (см. Главу 2, пп. 2.2.11.).

Полученные результаты, представленные в таблице 17, свидетельствуют о безвредности исследуемых метаболитов. Введение *per os* метаболитов исследуемых штаммов не приводило к гибели подопытных животных. Отсутствовали признаки интоксикации, беспокойства, угнетения двигательной активности и изменений поведенческих реакций. Снижение групповой массы тела мышей по сравнению с исходной не наблюдалось. Прибавка веса опытных животных соответствовала контрольным. Мыши свободно перемещались по клетке, нормально реагировали на раздражение.

Таблица 17 – Результаты исследования безвредности метаболитов *B. subtilis*

Группы	Метаболиты (0,5 мл)	Количество животных		Масса животных (г), Ме (Q1;Q3)		
		выживших	павших	до введения	через 1 сутки	Через 5 суток
1	<i>B. subtilis</i> 3Н	5	0	15,08 (14,97; 15,31)	15,18 (15,12; 15,37)	16,42 (16,25; 16,88)
2	<i>B. subtilis</i> 1719	5	0	15,39 (15,08; 15,41)	15,51 (15,17; 15,52)	16,68 (16,66; 17,07)
контроль	0,9% NaCl	5	0	15,24 (14,89; 15,27)	15,33 (14,95; 15,39)	16,62 (16,61; 16,97)

Таким образом, в результате проведенного эксперимента установлено, что метаболиты штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) являются безвредными.

3.3.2. Моделирование дисбиоза у мышей и его коррекция

Пробиотическое действие исследуемых метаболитов на макроорганизм изучали на модели экспериментального дисбиоза у лабораторных мышей. Для сравнения терапевтического эффекта использовали метабиотик "Бактистатин".

Микробиота желудочно-кишечного тракта представляет собой сложно организованную систему, в структуре которой выделяют две основные фракции: просветную и пристеночную. Формирование просветной микробиоты зависит от различных эндогенных и экзогенных факторов. Ее состав формируется благодаря взаимодействию индигенных и транзиторных микроорганизмов. Пристеночная микробиота содержится в муциновом слое и является важнейшим звеном в поддержании компонентов гомеостаза организма на местном и системном уровнях. Следовательно, качественные и количественные изменения данной фракции являются значимыми для организма [16, 36]. Состав пристеночной микробиоты каждого биотопа пищеварительного тракта различается, но остаётся постоянным, что связано со способностью микроорганизмов фиксироваться к строго определённым рецепторам эпителиальных клеток слизистой оболочки [126].

Из всех биотопов желудочно-кишечного тракта наибольший интерес представляет толстый кишечник, имеющий сложный, разнообразный и метаболически активный микробиом, оказывающий комплексное воздействие на состояние здоровья [114]. Исходя из вышеизложенного, в данном эксперименте представляло интерес изучить качественные и количественные изменения именно мукозной микробиоты толстого кишечника.

На протяжении эксперимента ни в одной из групп животных не наблюдали гибели, неожиданных изменений в потреблении пищи или поведении, и не было замечено статистически значимых различий в массе животных. Основные микроорганизмы, которые выделяли из биопроб мышей, идентифицировали по родам и сравнивали группы животных по их содержанию.

При исследовании мукозной микробиоты толстого кишечника контрольных мышей на всех этапах эксперимента идентифицированы бактерии *Lactobacillus* spp.

(*L. gasei*, *L. murinus*, *L. reuteri*, *L. intestinalis*), *Escherichia coli* (lac+), *Enterococcus* spp. (*E. gallinarium*, *E. faecalis*), *Rodentibacter* spp. (*R. pneumotropicis*, *R. heyliei*), *Streptococcus* spp. (*S. hyointestinalis*, *S. suis*), а также грибы *Kazachstania* spp. (*K. pintolopesii*).

Экспериментальный дисбиоз у мышей моделировали путём внутрибрюшинного введения в течение 5 дней раствора гентамицина (см. Главу 2, пп. 2.2.12).

Применение антибиотика привело к уменьшению (и/или исчезновению) бактериальной микрофлоры (Таблица 18). В биопробах животных с индуцированным дисбиозом наблюдали отсутствие роста бактерий *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Rodentibacter* spp., *Streptococcus* spp., а также увеличение содержания грибов *K. pintolopesii* в 1,39 раза по сравнению с контрольной группой. Кроме того, наблюдали появление грибов *Trichosporon* spp. (*T. asahii*) и *K. telluris*, отсутствовавших у здоровых мышей. По общему содержанию кишечной палочки не выявили статистически значимых изменений. При этом во второй группе (дисбиоз) зафиксировали снижение lac+ вариантов *E. coli* с 100% до 75% и появление lac- эшерихий с 0% до 25%. Гемолитические штаммы *E. coli* обнаружены не были. В единичных случаях зафиксировали присутствие бактерий *Cytobacillus oceanisediminis* (4 lg КОЕ/г), *Staphylococcus warneri* (7 lg КОЕ/г), *Stenotrophomonas maltophilia* (5 lg КОЕ/г).

Таблица 18 – Количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей в условиях экспериментального дисбиоза

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов (lg КОЕ/г), М±m, n=10	
	Группы животных	
	Контроль	Дисбиоз
<i>L. gasei</i>	6,3±0,36	-
<i>L. murinus</i>	5,4±0,43	-
<i>L. reuteri</i>	5,7±0,45	-
<i>L. intestinalis</i>	4,1±0,31	-
<i>E. coli</i>	5,7±0,45	4,8±0,44
lac+/lac-, %	100/0	75/25
<i>E. gallinarium</i>	4,1±0,31	-
<i>E. faecalis</i>	3,5±0,27	-
<i>R. pneumotropicis</i>	4,2±0,33	-
<i>R. heyltii</i>	3,5±0,43	-
<i>S. hyointestinalis</i>	4,8±0,51	-
<i>S. suis</i>	5,3±0,39	-
<i>A. viridans</i>	-	-
<i>K. pintolopesii</i>	4,4±0,27	6,1±0,31*
<i>K. telluris</i>	-	5,9±0,38
<i>T. asahii</i>	-	5,2±0,42

Примечания: «-» - отсутствие роста в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} ,
* $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

После моделирования дисбиоза было сформировано пять групп животных (см. Главу 2, пп. 2.2.12).

Через 7 дней после окончания введения антибиотика (Таблица 19) у мышей второй группы (дисбиоз), по сравнению с контрольной группой, наблюдали отсутствие бактерий *Lactobacillus* spp., *Rodentibacter* spp., *Streptococcus* spp. Появились энтерококки, количество которых было выше приблизительно в 1,3 раза относительно показателей контрольной группой. Содержание грибов *K. pintolopesii* увеличилось в 1,53 раза по сравнению со здоровыми животными. Кроме того, были

обнаружены *E. coli* lac- (20%), Аэрококки (*Aerococcus viridans*), а также грибы *K. telluris* и *T. asahii*. В единичных случаях наблюдали рост *R. pneumotropicis* (4 lg КОЕ/г).

Недельное применение метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н способствовало восстановлению количества и видового разнообразия лактобацилл до уровня контрольной группы. Происходила нормализация содержания кишечной палочки с полным исчезновением лактозонегативных вариантов и полная элиминация грибов *K. telluris* и *T. asahii*. Содержание энтерококков и *K. pintolopesii* снижалось до показателей здоровых животных. При этом в биопробах мышей обнаружены стрептококки, которые отсутствовали во второй группе (дисбиоз). Их количество соответствовало показателям контрольных мышей. Также отмечали наличие бактерий *A. viridans* без статистически значимых различий с уровнем животных с дисбиозом.

Коррекция дисбиоза с использованием метаболитов штамма *B. subtilis* 1719 в течение семи дней способствовала восстановлению бактерий *L. gasei* и *L. murinus*. При этом содержание *L. gasei* было в 1,29 раза ниже по сравнению с показателями контрольной группы. Другие виды лактобацилл обнаружены не были. В биопробах отсутствовали лактозонегативные эшерихии, однако общее количество кишечной палочки было снижено в 1,32 раза относительно показателей здоровых животных. Уровень энтерококков уменьшился до значений, характерных для контрольной группы. Также отмечали появление стрептококков, количество которых соответствовало животным первой группы (контроль), и полная элиминация грибов *T. asahii*. Бактерии *A. viridans* выявлены без статистически значимых различий относительно уровня у животных с дисбиозом. Количество грибов *Kazachstania* spp. оставалось неизменным по сравнению со второй группой (дисбиоз).

Применение Бактистатина в течение семи дней способствовало восстановлению *L. gasei* и *L. murinus* до уровня контрольной группы. При этом *L. reuteri* и *L. intestinalis* в биопробах обнаружено не было. Наблюдали восстановление содержания кишечной палочки с исчезновением лактозонегативных вариантов. Отмечали полную элиминацию энтерококков,

грибов *K. telluris* и *T. asahii*. Количество *K. pintolopesii* снизилось до уровня, характерного для контрольной группы. Кроме того, в биопробах появились бактерии *Rodentibacter* spp. и *Streptococcus* spp., численность которых соответствовала показателям контрольных животных. В то же время содержание *A. viridans* не изменилось и оставалось на уровне, наблюдаемом у животных с дисбиозом.

Таблица 19 – Количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после недельной коррекции дисбиоза

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов (lg КОЕ/г), M±m, n=10				
	Группы животных				
	Контроль	Группа 2 (Дисбиоз)	Группа 3 (ЗН)	Группа 4 (1719)	Группа 5 (Бактистатин)
<i>L. gasei</i>	6,7±0,47	-	6,9±0,38	5,2±0,33*	6,2±0,33
<i>L. murinus</i>	5,0±0,56	-	5,4±0,27	5,9±0,38	5,5±0,43
<i>L. reuteri</i>	5,8±0,51	-	5,7±0,45	-	-
<i>L. intestinalis</i>	4,8±0,39	-	4,5±0,43	-	-
<i>E. coli</i>	5,7±0,37	5,7±0,42	5,7±0,37	4,3±0,36* ^x	5,0±0,56
lac+/lac-, %	100/0	80/20	100/0	100/0	100/0
<i>E. gallinarium</i>	5,0±0,49	6,2±0,42*	5,2±0,33	4,8±0,51 ^x	-
<i>E. faecalis</i>	3,9±0,43	5,3±0,36*	3,7±0,45 ^x	4,1±0,31 ^x	-
<i>R. pneumotropicus</i>	3,7±0,39	-	-	-	4,5±0,64
<i>R. heyltii</i>	3,5±0,34	-	-	-	3,7±0,52
<i>S. hyointestinalis</i>	4,8±0,59	-	4,9±0,38	5,2±0,42	4,8±0,39
<i>S. suis</i>	4,9±0,52	-	4,5±0,34	4,2±0,70	4,3±0,39
<i>A. viridans</i>	-	5,0±0,56	4,4±0,43	5,0±0,56	5,1±0,50
<i>K. pintolopesii</i>	4,1±0,50	6,3±0,39*	4,0±0,52 ^x	5,7±0,37*	4,0±0,49 ^x
<i>K. telluris</i>	-	5,9±0,52	-	5,2±0,42	-
<i>T. asahii</i>	-	4,7±0,45	-	-	-

Примечания: «-» - отсутствие роста в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , * $p < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой; ^x $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с группой дисбиоз.

Через две недели коррекции дисбиоза у животных наблюдали устойчивую тенденцию к нормализации микробиоты (Таблица 20).

В биопробах мышей третьей, четвертой и пятой групп содержание и видовой состав лактобацилл соответствовали показателям контрольных животных. Частота обнаружения лактозонегативных эшерихий составила 100%.

Во всех группах животных, получавших терапию, отмечали отсутствие роста дрожжей *T. asahii*. В третьей (ЗН) и пятой (Бактистатин) группах наблюдали полную элиминацию грибов *Kazachstania* spp, тогда как в четвертой группе (1719) количество *K. pintolopesii* снижалось до показателей контрольных животных, а содержание *K. telluris* оставалось неизменным. В третьей группе (ЗН) была зафиксирована элиминация бактерий *A. viridans*.

У животных второй группы (дисбиоз), не получавших терапию, микробиота сохраняла ранее выявленный дисбаланс без изменений по сравнению с предыдущими показателями. Однако в единичных случаях в составе мукозной микробиоты идентифицировали *L. gasseri* в количестве $4 \lg$ КОЕ/г.

Таблица 20 – Количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после двухнедельной коррекции дисбиоза

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов (lg КОЕ/г), М±m, n=10				
	Группы животных				
	Контроль	Группа 2 (Дисбиоз)	Группа 3 (ЗН)	Группа 4 (1719)	Группа 5 (Бактистатин)
<i>L. gasei</i>	6,8±0,55	-	6,9±0,43	6,1±0,52	6,6±0,58
<i>L. murinus</i>	5,2±0,70	-	5,4±0,27	5,5±0,34	5,3±0,36
<i>L. reuteri</i>	5,9±0,67	-	5,7±0,52	5,3±0,39	5,9±0,38
<i>L. intestinalis</i>	5,0±0,49	-	5,2±0,33	4,9±0,38	5,2±0,42
<i>E. coli</i>	5,7±0,45	6,1±0,57	4,4±0,43 ^x	4,4±0,43 ^x	4,5±0,34 ^{*x}
lac+/lac-, %	100/0	80/20	100/0	100/0	100/0
<i>E. gallinarium</i>	4,3±0,36	6,5±0,64 [*]	4,2±0,33 ^x	4,5±0,43 ^x	-
<i>E. faecalis</i>	4,1±0,42	5,1±0,31	4,0±0,49	4,4±0,27	-
<i>R. pneumotropicis</i>	4,5±0,64	-	-	-	5,4±0,36
<i>R. heylii</i>	3,9±0,67	-	-	-	4,9±0,27
<i>S. hyointestinalis</i>	4,6±0,37	-	5,0±0,49	5,2±0,70	4,7±0,52
<i>S. suis</i>	4,4±0,34	-	4,7±0,52	5,3±0,54	4,3±0,39
<i>A. viridans</i>	-	5,0±0,49	-	4,3±0,39	4,7±0,45
<i>K. pintolopesii</i>	4,1±0,42	6,3±0,65 [*]	-	4,3±0,65 ^x	-
<i>K. telluris</i>	-	6,1±0,31	-	5,1±0,52	-
<i>T. asahii</i>	-	4,5±0,43	-	-	-

Примечания: «-» - отсутствие роста в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой; ^x $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с группой дисбиоз.

На 21-ый день после окончания введения гентамицина во второй группе (дисбиоз) наблюдалась тенденция к частичному восстановлению доминантной микробиоты (Таблица 21). У мышей данной группы были обнаружены лактобациллы, представленные одним видом – *L. gasseri*. Частота выявления лактозонегативных эшерихий составила 10%. У животных четвертой группы (1719) отмечали полную элиминацию бактерий *A. viridans*.

Таблица 21 – Количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после трехнедельной коррекции дисбиоза

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов (lg КОЕ/г), М±m, n=10				
	Группы животных				
	Контроль	Группа 2 (Дисбиоз)	Группа 3 (3Н)	Группа 4 (1719)	Группа 5 (Бактистатин)
<i>L. gasei</i>	6,2±0,65	4,0±0,42*	6,5±0,52 ^x	6,0±0,56 ^x	6,3±0,65 ^x
<i>L. murinus</i>	5,5±0,43	-	5,7±0,58	5,1±0,52	5,2±0,70
<i>L. reuteri</i>	5,9±0,38	-	5,5±0,34	5,4±0,42	6,0±0,49
<i>L. intestinalis</i>	4,4±0,27	-	4,4±0,43	4,5±0,27	4,5±0,64
<i>E. coli</i>	5,0±0,52	6,1±0,52	5,2±0,70	4,8±0,39	5,2±0,42
lac+/lac-, %	100/0	90/10	100/0	100/0	100/0
<i>E. gallinarium</i>	4,5±0,62	5,6±0,58	4,5±0,43	4,8±0,55	-
<i>E. faecalis</i>	4,0±0,56	4,3±0,39	4,3±0,65	4,0±0,49	-
<i>R. pneumotropicis</i>	5,2±0,70	-	-	-	4,3±0,39
<i>R. heyltii</i>	4,8±0,51	-	-	-	4,0±0,56
<i>S. hyointestinalis</i>	4,2±0,70	-	4,1±0,31	4,9±0,38	5,9±0,49
<i>S. suis</i>	4,0±0,54	-	4,2±0,33	5,2±0,39	4,4±0,34
<i>A. viridans</i>	-	4,5±0,27	-	-	4,7±0,37
<i>K. pintolopesii</i>	4,3±0,42	5,7±0,39*	-	4,6±0,58	-
<i>K. telluris</i>	-	5,2±0,31	-	4,0±0,39	-
<i>T. asahii</i>	-	4,1±0,38	-	-	-

Примечания: «-» - отсутствие роста в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой; ^x $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с группой дисбиоз.

В ходе эксперимента в муциновом слое толстого кишечника на разных этапах и во всех группах животных не удалось идентифицировать бактерии рода *Bifidobacterium*, характерные для данного биотопа. Однако в пробирках с дифференциально-диагностической средой Блаурокка после 24-48 ч инкубации визуально наблюдали «типичные» колонии бифидобактерий. Тем не менее, применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии и морфологического анализа выросших микроорганизмов не подтвердило их принадлежность к роду

Bifidobacterium. Схожие результаты описаны в работе Qiao H. et. al. [136], где бифидобактерии также не выделялись из биоматериала большинства экспериментальных групп и лишь эпизодически обнаруживались у мышей, получавших терапию бифидобактериями.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые метаболиты штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) оказывают положительное влияние на нормализацию микробиоценоза толстого кишечника при антибиотик-ассоциированном дисбиозе. Их применение способствовало восстановлению популяции лактобацилл, нормализации состава эшерихий и снижению содержания условно-патогенных микроорганизмов.

Тем не менее, в группах животных, получавших разные метабиотики, выявлены некоторые различия. Наилучшие результаты в восстановлении популяции лактобацилл продемонстрировали метаболиты штамма *B. subtilis* 3Н, о чем свидетельствуют их численность и разнообразие после недельной коррекции дисбиоза. Бактерии рода *Rodentibacter* (*R. pneumotropicis*, *R. heyltii*), ассоциированные с оппортунистическими инфекциями у грызунов, колонизировали толстый кишечник контрольных мышей, но исчезали при введении антибиотика. При коррекции дисбиоза метаболитами штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719 они не выявлялись, тогда как в группе животных, получавших метабиотик «Бактистатин», их содержание возрастало до уровня показателей контрольных мышей. Эффективность воздействия на бактерии рода *Enterococcus* (*E. gallinarium*, *E. faecalis*) также различалась между препаратами. Применение «Бактистатина» привело к полной элиминации энтерококков из муцинового слоя толстого кишечника, тогда как использование метаболитов штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719 способствовало снижению их содержания до уровня контрольных значений. Условно-патогенные бактерии *A. viridans*, появлявшиеся после моделирования дисбиоза, элиминировались через две недели лечения метаболитами *B. subtilis* 3Н и через 21 день при использовании метаболитов *B. subtilis* 1719, тогда как в группе «Бактистатина» их содержание оставалось неизменным. Грибы рода *Kazachstania* spp., часто ассоциированные с инфекциями у лабораторных мышей,

обнаруживались в микробиоте контрольных животных. Введение гентамицина вызывало увеличение численности *K. pintolopesii* в 1,53 раза и способствовало появлению *K. telluris*. Применение метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н и метабиотика «Бактистатин» способствовало полной элиминации этих дрожжей в течение 14 дней. Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 продемонстрировали ограниченное воздействие на грибы *K. pintolopesii*, снижая их содержание до уровня контрольных животных. При этом влияние на содержание *K. telluris* отсутствовало. Грибы рода *Trichosporon* (*T. asahii*), выявлявшиеся в пробах мышей после моделирования дисбиоза, исчезали после недельного применения метаболитов *B. subtilis* 3Н и 1719. В группе животных, получавших «Бактистатин», их элиминация наблюдалась через две недели коррекции.

Таким образом, выявленные различия в нормализации микробиоты толстого кишечника мышей обусловлены штаммоспецифическими особенностями метаболитов *B. subtilis*, лежащих в основе используемых метабиотиков. Проведенные эксперименты показали, что метаболиты штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) оказывают положительное влияние на микробиоценоз толстого кишечника и могут быть использованы как для избирательной коррекции дисбиоза, так и в качестве компонентов комплексных пробиотических препаратов с широким спектром действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Человек и населяющие его микроорганизмы являются единой симбиотической системой, которая начинает формироваться при рождении и находится в состоянии динамического равновесия, являясь естественным защитным механизмом от патологических воздействий [4, 13, 80, 118]. Различные факторы экзогенного и эндогенного характера способны приводить к дестабилизации данной системы, следствием чего являются качественные и количественные микроэкологические нарушения составов биотопов макроорганизма [41, 42, 131, 140, 175, 190].

Открытия и достижения современной науки позволили разработать и внедрить в практику различные препараты на основе пробиотических микроорганизмов для восстановления и поддержания микробиоценоза. Тем не менее, в настоящее время пробиотикотерапия столкнулась с определенным кризисом. Расширение ассортимента и увеличение частоты использования пробиотиков не приводят к ожидаемым результатам, что вызывает критику эффективности данных препаратов как в научных кругах, так и среди практикующих врачей [23, 27, 63, 130, 152]. Благодаря полученным знаниям о механизме действия пробиотиков, а именно о том, что их терапевтический эффект обусловлен продукцией различных биологически активных веществ, научным сообществом предложены биопрепараты на основе метаболитов пробиотических культур, не содержащих живых клеток, получившие название метабиотики (постбиотики) [158, 176, 179]. Ряд исследований подтвердил безопасность и эффективность такого способа коррекции микроэкологических нарушений [43, 45, 158].

В настоящее время открыто и охарактеризовано большое количество пробиотических микроорганизмов, потенциально обладающих положительным воздействием на организм. Их разнообразие связано с индивидуальным набором функций каждого штамма [40, 156, 198]. Наряду с представителями нормобиоты человека, исследователями активно изучаются спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, среди которых наиболее изученным является вид *B. subtilis* (сенная палочка) [79, 104, 198]. Эти микроорганизмы являются безопасными, о чем

свидетельствует присвоенный им в FDA (США) статус GRAS. Пробиотические штаммы бактерий рода *Bacillus* обладают способностью продуцировать широкий спектр биологически активных веществ, оказывающих благоприятное воздействие на организм человека [20, 25, 102, 146, 158, 195].

Объектами исследования в настоящей работе явились штаммы *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719, которые обладают высокой антагонистической активностью в отношении болезнетворных микроорганизмов, обладают ферментативными свойствами и являются безопасными [19, 20, 31, 48, 51, 52, 64]. Целью данной работы стало получение и изучение биологической активности их метаболитов.

На первом этапе исследования проведен подбор оптимальных условий культивирования бацилл. Из данных литературных источников известно, что глубинное периодическое культивирование является основным методом получения биологически активных веществ [7]. Так как сенная палочка является аэробом, ключевую роль для полноценного роста и биосинтеза выполняет кислород, содержание которого регулируется принудительной аэрацией и/или перемешиванием [2, 78]. С учетом этих условий, нами проведена оценка влияния различных компонентов питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов [30].

Результаты исследования показали, что использование промышленных гидролизатов в качестве источника азота (пептон, триптон, ПГК) оказывает различное влияние на антагонистическую активность метаболитов. Наилучшие показатели были зафиксированы при использовании триптона, который обеспечивал наиболее высокую антагонистическую активность метаболитов в отношении тест-штаммов золотистого стафилококка, протей и грибов рода *Candida*. В среде с пептоном метаболиты не демонстрировали антимикотической активности, а при использовании ПГК наблюдалось лишь слабое противомикробное действие, ограниченное тест-штаммами *S. aureus*.

Предположительно, различия в антагонистической активности обусловлены составом применяемых гидролизатов. Известно, что триптон обладает более

высоким содержанием аминокислот и пептидов, что способствует усилению биосинтетической активности исследуемых штаммов *B. subtilis*.

Важным элементом питательной среды, необходимым для полноценного роста и биосинтеза бацилл, является углеводный компонент. В результате проведенных исследований установлено, что добавление в среду глюкозы в конечной концентрации равной 1% существенно усиливало противомикробные свойства метаболитов, проявляемые в отношении всех тест-штаммов. Кроме того, проявилась активность метаболитов обоих штаммов бацилл по отношению к кишечной палочке, не выявленная ранее.

Внесение в состав питательной среды неорганических компонентов осуществляли при помощи анализа литературных данных и питательных сред, используемых для выращивания бактерий рода *Bacillus*. В результате разработана рецептура новой питательной среды для культивирования штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719), имеющая следующий состав (г/л): глюкоза безводная – 10; триптон – 10; калий фосфорнокислый 2-х замещенный 3-х водный – 0,5; железо сернокислое 7-ми водное – 0,01; марганец сернокислый 5-ти водный – 0,03; натрий хлористый – 5. В сравнении с питательными средами, применяемыми в производстве споровых пробиотиков и сред, предназначенных для культивирования бацилл, сконструированная питательная среда обеспечивала повышение противомикробной активности метаболитов.

В ходе исследования продолжительности культивирования штаммов бацилл на новой питательной среде установлено, что рост *B. subtilis* 3Н продолжался в течение 18 часов, далее культура переходила в стационарную фазу. При этом противомикробные метаболиты накапливались постепенно и достигали максимума к 30-ти часам выращивания. У штамма *B. subtilis* 1719 наблюдали другую картину. Активный рост продолжался до 24 часов выращивания и на каждом этапе противомикробная активность варьировала по отношению к тест-штаммам. В частности, активность против золотистого стафилококка и *C. albicans* достигала пика в логарифмической фазе, затем постепенно снижалась после прекращения роста. В отношении грамтрицательных тест-штаммов антибиотическое действие

проявлялось в конце активного роста и нарастало в стационарной фазе. Предполагается, что эти различия связаны с синтезом специфических противомикробных веществ штаммом *B. subtilis* 1719 на разных этапах роста. Оптимальным временем культивирования выбрана продолжительность процесса, соответствующая 36 часам. В этот период зарегистрирована высокая противомикробная активность метаболитов по отношению ко всем тест-штаммам. Таким образом, проведенные эксперименты по культивированию бацилл подтвердили данные различных литературных источников о зависимости синтеза противомикробных метаболитов от состава питательной среды [9, 19, 21, 76].

При фракционировании исследуемых метаболитов по молекулярной массе установлено, что противомикробная активность локализована во фракции с молекулярной массой менее 5 кДа. Белковые компоненты метаболитов, осажденные 10% раствором ТХУ, не проявляли антагонистических свойств. На основании этого можно заключить, что антимикробные метаболиты исследуемых штаммов *B. subtilis* относятся к низкомолекулярным соединениям. Анализ методом ВЭЖХ-МС выявил присутствие 23 соединений, которые накапливались в культуральной жидкости в процессе роста штамма *B. subtilis* 3Н. Из них удалось идентифицировать 11 соединений, включая два антибиотика: Мусинамицин VI – макролидный антибиотик, действующий в отношении грамположительных бактерий и Laurenobiolide – активный в отношении *S. aureus*.

Штаммы *B. subtilis* (3Н и 1719) известны своими ферментативными свойствами [20, 51, 53, 64]. Исходя из этого на следующем этапе работы проведено исследование ферментативной активности их метаболитов. Экспериментальные данные показали, что исследуемые метаболиты обладают протеолитической активностью, что подтверждается зонами гидролиза на молочном агаре. Медианные значения размера зон гидролиза составили 26,75 мм для штамма *B. subtilis* 3Н и 28,00 мм для штамма *B. subtilis* 1719. Также выявлена амилолитическая активность метаболитов, подтверждаемая зонами гидролиза крахмала с медианными значениями 21,00 мм и 24,50 мм соответственно.

Фракционирование метаболитов по молекулярной массе показало, что ферментативная активность сосредоточена во фракциях с молекулярной массой выше 30 кДа. Эти результаты, а также данные электрофореза, подтверждают наличие гидролитических ферментов в составе исследуемых метаболитов.

Известно, что в различных микробных сообществах, а также в патогенезе ряда бактериальных инфекций существенную роль играют биопленки [26, 59]. С этой целью проведено исследование влияния исследуемых метаболитов на способность ингибировать процесс формирования биопленок условно-патогенных микроорганизмов. Установлено, что под воздействием метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н биопленкообразование снижалось в 3,2 раза у штамма *S. aureus* FDA 209P, в 3 раза у *S. aureus* 29213, в 1,33 раза у *P. mirabilis* 24а и в 1,5 раза у *E. coli* ATCC 25922. Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 также продемонстрировали ингибирующее действие, снижая образование биопленки в 1,8 раза у *S. aureus* FDA 209P, в 1,5 раза у *S. aureus* 29213 и в 1,4 раза у *P. mirabilis* 24а. Полученные результаты, на наш взгляд, представляют интерес для дальнейшего изучения таких метаболитов, способа их выделения и очистки для разработки средств борьбы с инфекциями, ассоциированными с образованием биопленок.

Бактерии *B. subtilis* известны своей иммуностимулирующей активностью [94]. Однако, механизмы, за счет которых сенная палочка оказывает положительное воздействие на иммунную систему макроорганизма, продолжают изучаться. При помощи проточной цитометрии в составе исследуемых метаболитов обнаружены вещества, подобные интерлейкинам IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-13, IL-31, IL-33. Так как все идентифицированные вещества относятся к провосполительным цитокинам, можно предположить, что именно за счет их продукции *B. subtilis* оказывает иммуностимулирующее действие.

При определении параметров сохранения биологических свойств исследуемых метаболитов, установлено, что активность оставалась неизменной в условиях лиофилизации в течение всего срока наблюдения, соответствующего 12 месяцам.

После оценки биологической активности метаболитов в опытах *in vitro*, представляло интерес изучить их пробиотический эффект в макроорганизме.

Пробиотические свойства метаболитов изучали в условиях коррекции экспериментального дисбиоза, индуцированного введением гентамицина, у лабораторных мышей. Результаты исследования показали, что метаболиты *B. subtilis* оказывали положительное воздействие на микробиоценоз, о чем свидетельствовало нормализация содержания лактобацилл, состава эшерихий и снижением численности условно-патогенной микробиоты. Тем не менее, процесс восстановления микробиоценоза у мышей различался в зависимости от применяемого метабиотика. Мы предполагаем, что эти различия обусловлены индивидуальными биологическими особенностями штаммов *B. subtilis*, использованных в эксперименте.

Известно, что состав микробиоты уникален для каждого макроорганизма и варьирует в течение жизни [42, 125]. На наш взгляд, при назначении пробиотических препаратов необходимо учитывать их специфические свойства и назначать после исследования качественного и количественного состава микробиоценоза биотопов организма пациента.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены данные, расширяющие представления о функциональном потенциале штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719). Биологически активные метаболиты этих штаммов могут рассматриваться в качестве перспективных основ для разработки препаратов, предназначенных для избирательной коррекции дисбиотических нарушений, а также в качестве компонентов комплексных пробиотических препаратов, обладающих широким спектром действия.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выявлено противомикробное (цитотоксическое) действие метаболитов штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719, заключающиеся в деструкции мембран клеток условно-патогенных микроорганизмов.
2. Установлена зависимость синтеза противомикробных метаболитов штаммов от условий культивирования, включая состав питательной среды и продолжительность инкубации. Максимальную противомикробную активность наблюдали при культивировании на сконструированной питательной среде в течение 30-36 часов.
3. Определено, что противомикробная активность исследуемых метаболитов сосредоточена во фракции с молекулярной массой менее 5 кДа, в которой выявлено 23 низкомолекулярных соединения, накапливающихся в процессе культивирования и идентифицировано 2 антибиотика – Mucinamicin VI и Laurenobiolide с молекулярными массами 667,39 Да и 240,11 Да, соответственно.
4. Обнаружены протеолитические и амилолитические свойства исследуемых метаболитов. Установлено, что ферментативная активность сосредоточена во фракции с молекулярной массой более 30 кДа.
5. Выявлена способность исследуемых метаболитов подавлять процесс биопленкообразования условно-патогенных бактерий. Под воздействием метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н биопленкообразование снижалось в 3,2 раза у штамма *S. aureus* FDA 209P, в 3 раза у *S. aureus* 29213, в 1,33 раза у *P. mirabilis* 24a и в 1,5 раза у *E. coli* ATCC 25922. Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 снижали образование биопленки в 1,8 раза у *S. aureus* FDA 209P, в 1,5 раза у *S. aureus* 29213 и в 1,4 раза у *P. mirabilis* 24a.
6. В составе метаболитов обнаружены вещества, подобные цитокинам. Метаболиты *B. subtilis* 3Н содержат IL-8, IL-31, IL-1 β ; *B. subtilis* 1719 – IL-1 β , IL-13, IL-31, IL-33, IL-1 α .

7. Определены оптимальные условия хранения метаболитов, обеспечивающие стабильность их биологической активности в течение 12-ти месяцев. Наиболее эффективным методом является лиофильная сушка.
8. Доказана безвредность и установлена специфичность пробиотического действия исследуемых метаболитов при коррекции экспериментального дисбиоза толстого кишечника у лабораторных мышей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При производстве пробиотических препаратов на основе сенной палочки необходимо учитывать индивидуальные характеристики активности каждого штамма, что позволит их использовать в персонализированной терапии дисбиотических расстройств биотопов организма пациента.

2. Положительное влияние на индигенную микробиоту, установленное при коррекции экспериментального дисбиоза у лабораторных мышей, обосновывает применение метаболитов *B. subtilis* в качестве компонентов пробиотических препаратов синбиотического типа.

3. Выявленное ингибирующее действие на процесс биопленкообразования условно патогенных бактерий, аргументирует использование метаболитов *B. subtilis* в качестве биологического средства дезинфекции с целью применения в лечебно-профилактических учреждениях для снижения риска распространения возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В дальнейшем предполагается продолжить исследования состава метаболитов пробиотических штаммов *B. subtilis* (ЗН и 1719) с целью выделения веществ, обладающих противомикробной активностью. Так как, в связи с ростом и распространением антибиотикорезистентности среди бактерий, противомикробные метаболиты являются потенциальной альтернативой существующим антибиотикам.

Также представляют интерес для дальнейшего изучения цитокино-подобные вещества, идентифицированные в составе исследуемых метаболитов. Их структурно-молекулярные сходства и различия с цитокинами макроорганизма и роль в формировании пробиотического эффекта сенной палочки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БПО – биопленкообразование

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

НПС – нативная питательная среда

ОП – оптическая плотность

ПА – противомикробная активность

ПГК – панкреатический гидролизат казеина

ПС – питательная среда

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФА – ферментативная активность

ЦПВ – цитокино-подобные вещества

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамбеков, Д. А. Микробиота человека и ее значение (обзор литературы) / Д. А. Адамбеков, Б. Д. Хамзаев, А. Д. Адамбекова // Вестник Кыргызской государственной медицинской академии имени И. К. Ахунбаева. – 2019. – № 5-6. – С. 44-55.
2. Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* в отношении грибов дерматофитов / К. А. Лукманова, С. В. Гизатуллина, Р. Ш. Магазов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 4. – С. 21-23.
3. Аравийская, Е. Р. Микробиом: новая эра в изучении здоровой и патологически измененной кожи / Е. Р. Аравийская, Е. В. Соколовский // Вестник дерматологии и венерологии. – 2016. – № 3. – С. 102-109.
4. Ассоциативный симбиоз: научное издание / О. В. Бухарин, Е. С. Лобакова, Н. В. Немцева, С. В. Черкасов ; под ред. О. В. Бухарина. – Екатеринбург : УрО РАН, 2007. – 264 с. – ISBN 5-7691-1881-4.
5. Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев. – Ленинград : Медгиз, 1962. – 183 с. – ISBN 5-0637609-А.
6. Бактерии *Bacillus subtilis* – продуценты цитокиноподобных веществ / С. А. Лазарев, Е. О. Калиниченко, С. А. Сходова, Н. А. Михайлова // Актуальная биотехнология. – 2023. – №2. – С. 19-20. – Doi: 10.20914/2304-4691-2023-2-19-20.
7. Баснакьян, И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И. А. Баснакьян. – Москва : Медицина, 1992. – 191 с. : ил. – ISBN 5-225-02142-5
8. Бекпергенова, А. В. Биологические свойства микроорганизмов в ассоциациях облигатно-анаэробных бактерий кишечника человека : специальность 03.02.03 "Микробиология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Бекпергенова Анастасия Владимировна ; ФГБНУ "Научно-

исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова". – Москва, 2018. – 132 с.

9. Блинкова, Л. П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления / Л. П. Блинкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. – № 3. – С. 109-113.

10. Блинкова, Л. П. Метабиотики - перспективные средства терапии / Л. П. Блинкова, М. Л. Альтшулер // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2018. – № 2. – С. 56-57.

11. Бондаренко, В. М. Кишечная микрофлора, ожирение и диабет 2 типа / В.М. Бондаренко, В.В. Малеев, В.Г. Лиходед // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – Т.91. – № 3. – С. 42-49.

12. Бухарин, О. В. Микросимбиоз / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова. – Екатеринбург : УрО РАН, 2014. – 260 с. – ISBN 978-5-7691-2376-4.

13. Бухарин, О. В. Симбиотические отношения человека и микроорганизмов / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова // Физиология человека. – 2012. – Т. 38. – № 1. – С. 128.

14. Влияние пробиотиков бактистатин и нормобакт на состав микробиоценоза толстого кишечника при экспериментальном дисбиозе / Ю. А. Авдеева, О. А. Медведева, В. А. Королев, А. П. Калущий // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2016. – № 6(194). – С. 45-48.

15. Волков, М. Ю. Комбинированный пробиотический препарат Бактистатин и его эффективность при желудочно-кишечных болезнях сельскохозяйственных животных : специальность 03.01.06 "Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)" : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Волков Михаил Юрьевич ; ФГБОУ «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – Московская ветеринарная академия имени К. И. Скрябина». – Москва, 2006. – 418 с.

16. Воробьев, А. А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта у человека в норме и при патологии / А. А. Воробьев, Ю. В.

Несвижский, Е. М. Липницкий [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2004. – № 2. – С. 43-47.

17. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е. В. Шекунова, М. А. Ковалева, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 19-28. – Doi: 10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28.

18. Гаврилова, Н. Б. Научные и практические основы биотехнологии молочных и молочносодержащих продуктов с использованием иммобилизации клеток микроорганизмов : монография / Н. Б. Гаврилова, О. А. Гладилова, Н. Л. Чернопольская [и др.]. – Омск : Вариант-Омск, 2011. – ISBN 978-5-904754-40-2.

19. Гайдеров, А. А. Изучение свойств штаммов *Escherichia coli* М-17 и *Bacillus subtilis* 1719 на модели экспериментального дисбиоза : специальность 03.00.07 "Микробиология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Гайдеров Андрей Александрович ; ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы". – Москва, 2007. – 96 с.

20. Гатауллин, А. Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков : специальность 03.00.07 "Микробиология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Гатауллин Айрат Гафуанович ; ФГБНУ "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова". – Москва, 2005. – 131 с.

21. Гринько, О. М. Экспериментальное изучение антагонистических свойств штамма бактерий *Bacillus pumilus* "Пашков" : специальность 03.02.03 "Микробиология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Гринько Ольга Михайловна ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2010. – 143 с.

22. Действие состава питательной среды на синтез бацитрацина и спорообразование *B. licheniformis* 28 КА / Н. С. Егоров, Ж. К. Лория, С. Н.

Выборных [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 1986. – № 1. – С. 107-111.

23. Дисбиоз кишечника, здоровье человека и функциональное питание / И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских [и др.] // Теория и практика переработки мяса. – 2017. – Т. 2, № 4. – С. 44-61. – Doi: 10.21323/2414-438X-2017-2-4-44-61.

24. Ефимов, Б. А. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища / Б. А. Ефимов, Л. И. Кафарская, В. М. Коршунов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2002. – № 4. – С. 72-78.

25. Забокрицкий, Н. А. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus* / Н. А. Забокрицкий // Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке. – 2015. – Т. 17. – № 3. – С. 80-90.

26. Ильина, Т. С. Бактериальные биопленки: роль в хронических инфекционных процессах и поиск средств борьбы с ними / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2021. – Т. 39. – № 2. – С. 14-24. – Doi: 10.17116/molgen20213902114.

27. Исследование влияния больших доз пробиотика Бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета / И. Ю. Чичерин, И. В. Дармов, Н. В. Богачева [и др.] // Медицинский Советник Поволжья. – 2013. – Т. 1. – № 6. – С. 85-90.

28. Исследование пробиотической активности метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* при экспериментальном дисбиозе / С. А. Лазарев, Н. О. Вартанова, А. В. Поддубиков, Н. А. Михайлова // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2023. – Т. 23. – № 3-1. – С. 431-442. – Doi: 10.30895/2221-996X-2023-23-445.

29. Кишечная недостаточность и транслокация иерсиний псевдотуберкулеза (*Yersinia pseudotuberculosis*) при развитии экспериментальной генерализованной инфекции / И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А.

Лундовских [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – № 3(127). – С. 24-31.

30. Лазарев, С. А. Влияние состава питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* / С. А. Лазарев, В. Г. Арзуманян, Н. А. Михайлова // Бактериология. – 2021. – Т.6. – №2. – С. 38-42. – Doi: 10.20953/2500-1027-2021-2-38-42.

31. Лазарев, С. А. Противомикробные и ферментативные свойства метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* ЗН и *Bacillus subtilis* 1719 / С. А. Лазарев, Н. А. Михайлова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2023. – № 4. – С. 29-33. – Doi: 10.14427/jipai.2023.4.29.

32. Лифшиц, К. Х. Роль кишечной микробиоты и пробиотиков в педиатрии / К. Х. Лифшиц // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – Т. 6. – № 1. – С. 41-44.

33. Метабиотики: перспективы, вызовы и возможности / Б. А. Шендеров, Е. И. Ткаченко, М. М. Захарченко, А. В. Сеница // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 2. – № 13(388). – С. 43-48. – Doi: 10.33667/2078-5631-2019-2-13(388)-43-48.

34. Мечников, И. И. Этюды о природе человека (6-е издание) / И. И. Мечников. – Москва : Юрайт, 2020. – 1 с. – ISBN 978-5-534-11865-0.

35. Микробиоценоз кишечника / В. А. Алёшкин, А. В. Алёшкин, С. С. Афанасьев [и др.] // Вопросы диетологии. – 2015. – Т.5. – № 4. – С. 15-52.

36. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом / Ю. В. Несвижский, Е. А. Богданова, В. В. Зверев, А. А. Воробьев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – №. 3. – С. 57-60.

37. Микробиоценоз, иммунная система и наследственность / Д. А. Воеводин, А. В. Розанова, А. В. Поддубиков, Н.А. Михайлова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 2. – С. 116-126. – Doi: 10.36233/0372-9311-2017-2-116-126.

38. Микробиоценозы и здоровье человека / В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, А. В. Караулов [и др.]. – Москва : Династия, 2015. – 548 с. – ISBN 978-5-98125-099-6.
39. Микрoэкология: фундаментальные и прикладные проблемы: монография / Л. С. Бакулина, Б. В. Гайдар, В. М. Добрынин [и др.] ; под редакцией Н. Н. Плужникова, Я. А. Накатиса, О. Г. Хурцилавы. – Санкт-Петербург : СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2012. – 304 с. : ил. – ISBN 978-5-89588-047-0.
40. Михайлова, Н. А. Бактерии рода *Bacillus* - продуценты биологически активных веществ антимикробного действия / Н. А. Михайлова, О. М. Гринько // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 3. – С. 85-89.
41. Михайлова, Н. А. Коррекция дисбиоза - основа регенеративной медицины / Н. А. Михайлова, Д. А. Воеводин, А. В. Поддубиков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 5. – С. 107-113. – Doi: 10.36233/0372-9311-2018-5-107-113.
42. Михайлова, Н. А. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека - основа создания нового поколения пробиотических препаратов / Н. А. Михайлова, Д. А. Воеводин, С. А. Лазарев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – № 4. – С. 346-355. – Doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-4-7.
43. Новые подходы к комплексному лечению синдрома кишечной недостаточности как важный компонент постагрессивной реабилитации хирургических больных в критическом состоянии / Г. Е. Иванова, Т. С. Попова, А. Е. Шестопапов [и др.] // Вестник восстановительной медицины. – 2018. – Т 4. – № 86. – С. 42-53.
44. Нужны ли коммерческим пробиотикам микробные клетки? / И. Ю. Чичерин, И. В. Дармов, И. А. Лундовских [и др.] // Журнал международной медицины. – 2014. – Т. 1. – № 6. – С. 12.
45. Олескин, А. В. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы / А. В. Олескин, Б. А. Шендеров // Физическая и реабилитационная

медицина, медицинская реабилитация. –2020. – Т. 2. – № 3. – С. 233-243. – Doi: 10.36425/rehab25811.

46. Омельченко, Н. Н. Профилактическая коррекция микрофлоры кишечника кроликов при дисбактериозе и её влияние на иммунобиологический статус организма : специальность 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Омельченко Николай Николаевич ; ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина». – Краснодар, 2018. – 148 с.

47. Орешко, Л. С. Метабиотики последнего поколения в лечении синдрома нарушенного пищеварения у больных целиакией / Л. С. Орешко, З. М. Цховребова, С. С. Леденцова // Фарматека. – 2017. – № 2(335). – С. 50-55.

48. Патент № 2067616 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A61K 35/74, C12R 1/125, C1 (2006.01). Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, несущий свойство антибиотикорезистентности, используемый для получения препарата "Бактиспорин" : № 95105920/13 : заявл. 25.04.1995 : опубл. 10.10.1996 / Михайлова Н. А., Кузнецова Т. Н., Кунягина О. В. // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2067616C1_19961010 (дата обращения: 12.05.2022).

49. Патент № 2142287 Российская Федерация, МПК A61K 35/74, C12N 1/20, C12R 1/07, C1 (2006.01). Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, используемые в качестве компонентов препарата против вирусных и бактериальных инфекций, и препарат на основе этих штаммов : № 97121774/13 : заявл. 16.12.1997 : опубл. 10.12.1999 / Щелкунов С. Н., Петренко В. А., Рязанкина О. Н., Репин В. Е., Андреева И. С., Ильичев А. А., Белявская В. А., Сандахчиев Л. С., Серпинский О. И., Сиволобова Г. Ф., Синяков А. Н., Перминова Н. Г., Тимофеев И. В., Лемяк А. И., Ноздрин Г. А., Катковский Л. П., Данилюк Н. К., Масычева В. И. // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2142287C1_19991210 (дата обращения: 12.05.2022).

50. Патент № 2287335 Российская Федерация, МПК А61К 35/74, А61Р 1/00, С1 (2006.01). Препарат для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта "Бактистатин": N 2005138934/13: заявл. 15.12.2005: опубл. 20.11.2006 / Волков М. Ю., Васильев П. Г., Воробейчиков Е. В., Сеница А. В., Рогожин А. З., Котельников Р. В. // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2287335C1_20061120 (дата обращения: 12.05.2022).

51. Патент № 2298032 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, С12N 9/14, С2 (2006.01). Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 -продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилолитических и липолитических ферментов : № 2005111301/13 : заявл. 19.04.2005 : опубл. 27.04.2007 / Михайлова Н. А., Гатауллин А. Г. // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2298032C2_20070427 (дата обращения: 12.05.2022).

52. Патент № 2665547 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А01N 63/02, А61К 35/742, С1 (2006.01). Бесклеточная культуральная жидкость на основе штамма *Bacillus subtilis*, консервант для силоса и полифункциональное средство для растений с фунгицидными, бактерицидными и ростстимулирующими свойствами : № 2017117228 : заявл. 17.05.2017 : опубл. 30.08.2018 / Кузнецова Т. Н., Кузнецов В. И., Кузнецова М. В. // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2665547C1_20180830 (дата обращения: 12.05.2022).

53. Патент № 2686337 Российская Федерация, МПК G01N 33/50 (2006.01), С1 (2006.01). Способ определения противомикробной активности цельной сыворотки и фракции её антимикробных пептидов: N 2018124240: заявл. 03.07.2018: опубл. 25.04.2019 /Арзуманян В. Г., Михайлова Н. А., Артемьева Т. А., Бутовченко Л. М., Вартанова Н. О., Ерофеева Т. В., Костинов М. П., Киселевский М. В., Полищук В. Б. // яндекс ру: электрон. справочник патентов России URL: https://yandex.ru/patents/doc/RU2686337C1_20190425 (дата обращения: 12.05.2022).

54. Плотникова, Е. Ю. Место пробиотиков в современной клинической практике / Е. Ю. Плотникова, Ю. В. Захарова // Педиатрия. Приложение к журналу

Consilium Medicum. – 2018. – № 1. – С. 95-99. – Doi: 10.26442/2413-8460_2018.1.95-99.

55. Плотникова, Е. Ю. Эффекты активных метаболитов *Bacillus subtilis* в пробиотическом продукте нового поколения / Е. Ю. Плотникова // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2018. – Т. 2. – № 3. – С. 39-44.

56. Применение пробиотиков в лечении патологии тканей ротовой полости / А. В. Митронин, Т. П. Вавилова, О. А. Перевощикова, И. Г. Островская // Российская стоматология. – 2013. – Т. 6. – № 2. – С. 13-19.

57. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О. В. Федорова, А. И. Назмиева, Э. И. Нуретдинова, Р. Т. Валеева // Вестник Технологического университета. – 2016. – Т. 19. – № 15. – С. 170-174.

58. Промышленное производство биологически активных веществ / А. Ю. Просеков, О. В. Кригер, Л. С. Дышлок, Л. К. Асякина. – Кемерово : Кемеровский государственный университет, 2020. – 82 с. – ISBN 978-5-8353-2687-7.

59. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia* / Т. В. Степанова, Ю. М. Романова, Н. В. Алексеева [и др.] // Медицинский алфавит. – 2010. – Т. 1. – № 2. – С. 47-51.

60. Руководство по медицинской микробиологии: Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. Учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / А. С. Лабинская, Н. Н. Костюкова, В. А. Арсланова [и др.]. – Москва : "БИНОМ. Лаборатория знаний", 2020. – 752 с. – ISBN 978-5-9518-0536-2.

61. Ситкин, С. И. Метаболический дисбиоз кишечника и его биомаркеры / С. И. Ситкин, Е. И. Ткаченко, Т. Я. Вахитов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – № 12(124). – С. 6-29.

62. Топчий, Н. В. Хилак форте – надежный помощник общепрактикующего врача / Н. В. Топчий // Русский медицинский журнал. – 2013. – № 21. – С. 1023-1030.

63. Транслокация кишечной микробиоты / И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских [и др.] // Журнал международной медицины. – 2016. – Т. 4. – № 29. – С. 87-100.

64. Холодная, Ж. В. Разработка технологии получения протеолитического ферментного комплекса из бактерий рода *Bacillus* : специальность 03.00.07 "Микробиология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Холодная Жанна Валерьевна ; Уфимский НИИВС им. И.И. Мечникова НПО "Иммунопрепарат" – Уфа, 1999. – 134 с.

65. Черкасов, С. В. Ассоциативный симбиоз как биологическая основа колонизационной резистентности хозяина (на модели женского репродуктивного тракта) : специальность 03.02.03 "Микробиология" : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Черкасов Сергей Викторович ; ГОУ ВПО "Оренбургская государственная медицинская академия". – Оренбург, 2011. – 220 с.

66. Шарипова, М. Р. Поздние стадии секреции белков у бацилл / М. Р. Шарипова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – № 11. – С. 1461-1472.

67. Яблокова, Е. А. Пробиотики: современный инструмент в руках клинициста / Е. А. Яблокова, А. В. Горелов // Педиатрия. – 2018. – № 4. – С. 59-62. – Doi: 10.26442/24138460.2018.4.180078.

68. A framework for human microbiome research / C. Huttenhower, D. Gevers, R. Knight, [et al.] // Nature. – 2012. – № 486. – P. 215-221. – Doi: 10.1038/nature11209.

69. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes, [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 4,464. – № 7285. – P. 59-65. – Doi: 10.1038/nature08821.

70. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin, Y. Li, Z. Cai [et al.] // Nature. – 2012. – № 490. – P. 55-60. – Doi: 10.1038/nature11450.

71. Abdel-Mawgoud, A. M. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5 / A. M. Abdel-Mawgoud, M. M. Aboulwafa, N. A. Hassouna //

Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2008. – Vol. 150. – № 3. – P. 305-325. – Doi: 10.1007/s12010-008-8155-x.

72. Abratt, V.R. Oxalate-degrading bacteria of the human gut as probiotics in the management of kidney stone disease / V. R. Abratt, S. J. Reid // *Advances in Applied Microbiology*. – 2010. – № 72. – P. 63-87. – Doi: 10.1016/S0065-2164(10)72003-7.

73. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome / J. Li, H. Jia, X. Cai, [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2014. – Vol. 32. – № 8. – P. 834-841. – Doi: 10.1038/nbt.2942.

74. Analysis of host-inducing proteome changes in *Bifidobacterium longum* NCC2705 grown in vivo / J. Yuan, B. Wang, Z. Sun, [et al.] // *The Journal of Proteome Research*. – 2008. – № 7. – P. 375-385. – Doi: 10.1021/pr0704940.

75. Antibiotic treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome / M. Pimentel, C. Chang, K. S. Chua, [et al.] // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2014. – Vol. 59. – № 6. – P. 1278-1285. – Doi: 10.1007/s10620-014-3157-8.

76. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production / L. I. Ouoba, B. Diawara, L. Jespersen, M. Jakobsen // *The Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – Vol. 102. – № 4. – P. 963-970. – Doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03156.x.

77. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* / A. Arena, T. L. Maugeri, B. Pavone, [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2006. – Vol. 6. – № 1. – P. 8-13. – Doi: 10.1016/j.intimp.2005.07.004.

78. *Bacillus alcalophilus* peptidoglycan induces IFN-alpha-mediated inhibition of vaccinia virus replication / G. Liu, Q. Zhai, D. Schaffner, [et al.] // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42. – № 2. – P. 197-204. – Doi: 10.1016/j.femsim.2004.05.002.

79. *Bacillus* as Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives / F. Elshagabee, N. Rokana, R. D. Gulhane, [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – № 8. – P. 1490. – Doi: 10.3389/fmicb.2017.01490.

80. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development / X. Z. Huang, L. B. Zhu, Z. R. Li, J. Lin // *World Journal of Clinical Pediatrics*. – 2013. – Vol. 2. – № 4. – P. 46-53.
81. Berditsch, M. The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation / M. Berditsch, S. Afonin, A. S. Ulrich // *Applied and Environmental Microbiology Journal*. – 2007. – Vol. 73. – № 20. – P. 6620-6628. – Doi: 10.1128/AEM.00881-07.
82. Bizani, D. Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation / D. Bizani, A. Brandelli // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – Vol. 65. – № 2. – P. 158-162. – Doi: 10.1007/s00253-004-1570-1.
83. Blaut, M. Gut microbiota and energy balance: role in obesity / M. Blaut // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2015. – Vol. 74. – № 3. – P. 227-234. – Doi: 10.1017/S0029665114001700.
84. Brain foginess, gas and bloating: a link between SIBO, probiotics and metabolic acidosis / S. Rao, A. Rehman, S. Yu, N. M. Andino // *Clinical and Translational Gastroenterology*. – 2018. – Vol. 9. – № 6. – P. 162. – Doi: 10.1038/s41424-018-0030-7.
85. Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans* / Y. Ota, H. Tamegai, F. Kudo, [et al.] // *The Journal of Antibiotics*. – 2000. – Vol. 53. – № 10. – P. 1158-1167. – Doi: 10.7164/antibiotics.53.1158.
86. Cencic, A. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health / A. Cencic, W. Chingwaru // *Nutrients*. – 2010. – Vol. 2, – № 6. – P. 611-625. – Doi: 10.3390/nu2060611.
87. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110 / A. Cherif, W. Rezgui, N. Raddadi, [et al.] // *Microbiological Research*. – 2008. – Vol. 163. – № 6. – P. 684-692. – Doi: 10.1016/j.micres.2006.10.005.
88. Cho, I. The human microbiome: at the interface of health and disease / I. Cho, M. J. Blaser // *Nature Reviews Genetics*. – 2012. – Vol. 13. – № 4. – P. 260-270. – Doi: 10.1038/nrg3182.

89. Classification and Multifaceted Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* Group: A Comprehensive Review / S. Iqbal, F. Begum, A. A. Rabaan, [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 3. – P. 927. – Doi: 10.3390/molecules28030927.
90. Classification of a bacterial isolate, from pozol, exhibiting antimicrobial activity against several gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts, and molds / P. Ray, C. Sanchez, D. J. O'Sullivan, L. L. McKay // *The Journal of Food Protection*. – 2000. – Vol. 63. – № 8. – P. 1123-1132. – Doi: 10.4315/0362-028x-63.8.1123.
91. Cloning and characterization of the DNA region responsible for Megacin A-216 production in *Bacillus megaterium* 216 / A. Kiss, G. Baliko, A. Csorba, [et al.] // *The Journal of Bacteriology*. – 2008. – Vol. 190. – № 19. – P. 6448-6457. – Doi: 10.1128/JB.00557-08.
92. Collado, M. C. Postbiotics: facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition / M. C. Collado, G. Vinderola, S. Salminen // *Beneficial Microbes*. – 2019. – Vol. 10. – № 7. – P. 711-719. – Doi: 10.3920/BM2019.0015.
93. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing / C. Kasai, K. Sugimoto, I. Moritani, [et al.] // *BMC Gastroenterology*. – 2015. – № 15. – P. 100. – Doi: 10.1186/s12876-015-0330-2.
94. Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection / K. Okamoto, M. Fujiya, T. Nata, [et al.] // *The International Journal of Colorectal Disease*. – 2012. – Vol. 27. – № 8. – P. 1039-1046. – Doi: 10.1007/s00384-012-1416-8.
95. Crosstalk Between Gut Microbiota and Innate Immunity and Its Implication in Autoimmune Diseases / Y. Jiao, L. Wu, N. D. Huntington, X. Zhang // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – № 11. – P. 282. – Doi: 10.3389/fimmu.2020.00282.
96. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease / J.

U. Scher, C. Ubeda, A. Artacho, [et al.] // *Arthritis & Rheumatology*. – 2015. – Vol. 67. – № 1. – P. 128-139. – Doi: 10.1002/art.38892.

97. Demehri, F. R. Changes to the Intestinal Microbiome with Parenteral Nutrition: Review of a Murine Model and Potential Clinical Implications / F. R. Demehri, M. Barrett, D. H. Teitelbaum // *Nutrition in Clinical Practice*. – 2015. – Vol. 30. – № 6. – P. 798-806. – Doi: 10.1177/0884533615609904.

98. Derrien, M. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota / M. Derrien, J. E. van Hylckama Vlieg // *Trends in Microbiology*. – 2015. – Vol. 23. – № 6. – P. 354-366. – Doi: 10.1016/j.tim.2015.03.002.

99. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9 / A. Cherif, S. Chehimi, F. Limem, [et al.] // *The journal of Applied Microbiology*. – 2003. – Vol. 95. – № 5. – P. 990-1000. – Doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02089.x.

100. Determination of Twenty Proteinogenic Amino Acids and Additives in Cultural Liquid by High-Performance Liquid Chromatography / A. D. Askretkov, A. A. Klishin, D. I. Zybin [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2020. – № 75. – P. 1038-1045. – Doi: 10.1134/S1061934820080031

101. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics / G. R Gibson, H. M. Probert, J. V. Loo, [et al.] // *Nutrition Research Reviews*. – 2004. – Vol. 17. – № 2. – P. 259-275. – Doi: 10.1079/NRR200479.

102. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins / H. Abriouel, C. M. Franz, N. Ben Omar, A. Gálvez // *FEMS Microbiol Reviews*. – 2011. – Vol. 35. – № 1. – P. 201-232. – Doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.

103. DuPont, A. W. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut / A. W. DuPont, H. L. DuPont // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2011. – Vol. 8. – № 9. – P. 523-531. – Doi: 10.1038/nrgastro.2011.133.

104. Earl, A. M. *Bacillus subtilis* genome diversity / A. M. Earl, R. Losick, R. Kolter // *Journal of Bacteriology*. – 2007. – Vol. 189. – № 3. – P. 1163-1170. – Doi: 10.1128/JB.01343-06.

105. Effect of pH and Temperature on *Bacillus subtilis* FNCC 0059 Oxalate Decarboxylase Activity // T. Nur Indah Koni, Rusman, C. Hanim, Zuprizal // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2017. – Vol. 20. – № 9. – P. 436-441. – Doi: 10.3923/pjbs.2017.436.441.
106. Effects of *Lactobacillus* GG on gene expression pattern in small bowel mucosa / S. Di Caro, H. Tao, A. Grillo, [et al.] // Digestive and Liver Disease. – 2005. – № 37. – P. 320-329. – Doi: 10.1016/j.dld.2004.12.008.
107. Effects of microbial-derived biotics (meta/pharma/post-biotics) on the modulation of gut microbiome and metabolome; general aspects and emerging trends / A. Sadeghi, M. Ebrahimi, M. S. Kharazmi, [et al.] // Food Chemistry. – 2023. – № 411. – P. 135478. – Doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135478.
108. Ehling-Schulz, M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential / M. Ehling-Schulz, D. Lereclus, T. M. Koehler // Microbiology Spectrum. – 2019. – Vol. 7. – № 3. – P. 10. – Doi: 10.1128/microbiolspec.
109. Enhanced production of bacitracin via energy metabolism engineering in *Bacillus licheniformis* DW2 / Q. Zhang, S. Zhu, N. Cui, [et al.] // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. – 2020. – Vol. 36. – № 6. – P. 1126-1137. – Doi: 10.13345/j.cjb.190464.
110. Enzyme therapy: a forerunner in catalyzing a healthy society? / S. Datta, K. N. Rajnish, C. George Priya Doss, [et al.] // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2020. – Vol. 20. – № 10. – P. 1151-1174. – Doi: 10.1080/14712598.2020.1787980.
111. Erva, R. R. Multilevel statistical optimization of l-asparaginase from *Bacillus subtilis* VUVD001 / R. R. Erva, T. C. Venkateswarulu, B. Pagala // 3 Biotech. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 24. – Doi: 10.1007/s13205-017-1020-2.
112. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / C. Hill, F. Guarner, G. Reid, [et al.] // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2014. – № 11. – P. 506-514. – Doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

113. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model / T. T. Hoa, L. H. Duc, R. Istatico, [et al.] // Applied and Environmental Microbiology Journal. – 2001. – Vol. 67. – № 9. – P. 3819-3823. – Doi: 10.1128/AEM.67.9.3819-3823.2001.
114. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia / A. Tomova, V. Husarova, S. Lakatosova, [et al.] // Physiology & Behavior. – 2015. – №138. – P. 179-187. – Doi: 10.1016/j.physbeh.2014.10.033.
115. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis / B. O. McElhanon, C. McCracken, S. Karpen, W. G. Sharp // Pediatrics. – 2014. – Vol. 133. – № 5. – P. 872-883. – Doi: 10.1542/peds.2013-3995.
116. Gerard, P. Gut microbiota and obesity / P. Gerard // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2016. – Vol. 73. – № 1. – P. 147-162. – Doi: 10.1007/s00018-015-2061-5.
117. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics / G. R. Gibson, M. B. Roberfroid // The Journal of Nutrition. – 1995. – Vol. 125. – № 6. – P. 1401-1412. – Doi: 10.1093/jn/125.6.1401.
118. Goodacre, R. Metabolomics of a Superorganism / R. Goodacre // The Journal of Nutrition. – 2007. – Vol. 137. – № 1. – P. 259-266, – Doi: 10.1093/jn/137.1.259S.
119. Gout, stone composition and urinary stone risk: a matched case comparative study / G. S. Marchini, C. Sarkissian, D. Tian, [et al.] // The Journal of Urology. – 2013. – Vol. 189. – № 4. – P. 1334-1339. – Doi: 10.1016/j.juro.2012.09.102.
120. Gram-negative bacteria account for main differences between faecal microbiota from patients with ulcerative colitis and healthy controls / L. K. Vignæs, J. Brynskov, C. Steenholdt, [et al.] // Beneficial Microbes. – 2012. – Vol. 3. – № 4. – P. 287-297. – Doi: 10.3920/BM2012.0018.
121. Guarner, F. Probiotics / F. Guarner, G. J. Schaafsma // The International Journal of Food Microbiology. – 1998. – № 39. – P. 237-238.
122. Gupta, V. Probiotics / V. Gupta, R. Garg // Indian Journal of Medical Microbiology. – 2009. – Vol. 27. – № 3. – P. 202-209. – Doi: 10.4103/0255-0857.53201.
123. Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease // R.

Krajmalnik-Brown, C. Lozupone, D. W. Kang, J. B. Adams // *Microbial Ecology in Health and Disease*. – 2015. – № 26. – P. 26914. – Doi: 10.3402/mehd.v26.26914.

124. Gut microbiota and metabolic syndrome / D. Festi, R. Schiumerini, L. H. Eusebi, [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20. – № 43. – P. 16079-16094. – Doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16079.

125. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice / V. K. Ridaura, J. J. Faith, F. E. Rey, [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 341. – P. 1241214. – Doi: 10.1126/science.1241214.

126. Gut microbiota in health and disease / I. Sekirov, S. L. Russell, L. C. Antunes, B. B. Finlay // *Physiological Reviews*. – 2010. – Vol. 90. – № 3. – P. 859-904. – Doi: 10.1152/physrev.00045.2009.

127. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice / A. M. Caricilli, P. K. Picardi, L. L. de Abreu, [et al.] // *PLoS Biology*. – 2011. – Vol. 9. – № 12. – P. 201-212. – Doi: 10.1371/journal.pbio.1001212.

128. Gut microbiota, inflammation, and molecular signatures of host response to infection / W. Gou, Y. Fu, L. Yue, [et al.] // *The Journal of Genetics and Genomics*. – 2021. – Vol. 48. – № 9. – P. 792-802. – Doi: 10.1016/j.jgg.2021.04.002.

129. Gut-Brain-Microbiota Axis: Antibiotics and Functional Gastrointestinal Disorders / T. Karakan, C. Ozkul, E. Küpeli Akkol, [et al.] // *Nutrients*. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 389. – Doi: 10.3390/nu13020389.

130. Hamilton-Miller, J. M. Some insights into the derivation and early uses of the word «probiotic» / J. M. Hamilton-Miller, G. R. Gibson, W. Bruck // *The British Journal of Nutrition*. – 2003. – Vol. 90. – № 4. – P. 845. – Doi: 10.1079/bjn2003954.

131. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of *Enterobacteriaceae* / C. Lupp, M. L. Robertson, M. E. Wickham, [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2007. – Vol. 2. – № 2. – P. 119-129. – Doi: 10.1016/j.chom.2007.06.010.

132. Human microbiome science: vision for the future / J. Ravel, M. J. Blaser, J. Braun, [et al.] // *Microbiome*. – 2014. – № 2. – P. 16. – Doi: 10.1186/2049-2618-2-16.

133. Hyronimus, B. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4 / B. Hyronimus, C. Le Marrec, M. C. Urdaci // *The Journal of Applied Microbiology*. – 1998. – Vol. 85. – № 1. – P. 42-50. – Doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00466.x.
134. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis* / H. D. Paik, S. S. Bae, S. H. Park, J. G. Pan // *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 1997. – Vol. 19. – № 4. – P. 294-298. – Doi: 10.1038/sj.jim.2900462.
135. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis / D. A. Peterson, N. P. McNulty, J. L. Guruge, J. I. Gordon // *Cell Host & Microbe*. – 2007. – Vol. 15,2. – № 5. – P. 328-339. – Doi: 10.1016/j.chom.2007.09.013.
136. Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with *Bifidobacteria* and prebiotic supplements / H. Qiao, L. C. Duffy, E. Griffiths, [et. al.] // *Pediatric Research*. – 2002. – Vol. 51. – № 6. – P. 750-755. – Doi: 10.1203/00006450-200206000-00015.
137. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life / E. Nova, J. Warnberg, S. Gomez-Martinez, [et al.] // *The British Journal of Nutrition*. – 2007. – Vol. 98. – № 1. – P. 90-95. – Doi: 10.1017/S0007114507832983.
138. Impact of Oral Hygiene Discontinuation on Supragingival and Salivary Microbiomes / D. Belstrom, M. L. Sembler-Moller, M. A. Grande, [et al.] // *Earthquake Spectra*. – 2018. – Vol. 3. – № 1. – P. 57-64. – Doi: 10.1177/87552930221111193.
139. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease / J. D. Lewis, E. Z. Chen, R. N. Baldassano, [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2015. – Vol. 18. – № 4. – P. 489-500. – Doi: 10.1016/j.chom.2015.09.008.
140. Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies / S. L. Schnorr, K. Sankaranarayanan, C. M. Lewis, C. Warinner // *Current Opinion in Genetics and Development*. – 2016. – № 41. – P. 14-26. – Doi: 10.1016/j.gde.2016.07.003.

141. Integrated metagenomics/metaproteomics reveals human host-microbiota signatures of Crohn's disease / A. R. Erickson, B. L. Cantarel, R. Lamendella, [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – № 11. – P. e49138. – Doi: 10.1371/journal.pone.0049138.
142. Interactional mechanisms of *Paenibacillus polymyxa* SC2 and pepper (*Capsicum annum* L.) suggested by transcriptomics / H. Liu, Y. Li, K. Ge, [et al.] // BMC Microbiology. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 70. – Doi: 10.1186/s12866-021-02132-2.
143. Interactions between the intestinal microbiota and bile acids in gallstones patients / N. Keren, F. M. Konikoff, Y. Paitan, [et al.] // Environmental Microbiology Reports. – 2015. – Vol 7. – № 6. – P. 874-880. – Doi: 10.1111/1758-2229.12319.
144. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus / A. Hevia, C. Milani, P. Lopez, [et al.] // MBio. – 2014. – Vol. 5. – № 5. – P. e01548 –Doi: 10.1128/mBio.01548-14.
145. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report / M. Simren, G. Barbara, H. J. Flint, [et al.] // Gut. – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 159-176. – Doi: 10.1136/gutjnl-2012-302167.
146. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6 / H. B. Ayed, H. Maalej, N. Hmidet, M. Nasri // The Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2015. – Vol. 3. – № 4. – P. 255-261. – Doi: 10.1016/j.jgar.2015.07.001.
147. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins / E. A. Svetoch, N. J. Stern, B. V. Eruslanov, [et al.] // The Journal of Food Protection. – 2005. – V. 68. – № 1. – P. 11-17. – Doi: 10.4315/0362-028x-68.1.11.
148. Jiang, S. The Impact of Probiotic *Bacillus subtilis* on Injurious Behavior in Laying Hens / S. Jiang, J. Y. Hu, H. W. Cheng // Animals (Basel). – 2022. – Vol. 12. – № 7. – P. 870. – Doi: 10.3390/ani12070870.
149. Johnston, B. C. Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials / B. C. Johnston, A. L. Supina, S.

Vohra // *The Canadian Medical Association Journal*. – 2006. – Vol. 175. – № 4. – P. 377-383. – Doi: 10.1503/cmaj.051603.

150. Kaneda, M. New antifungal antibiotics, bacillopeptins and fusaricidins / M. Kaneda, Y. Kajimura // *Yakugaku Zasshi*. – 2002. – Vol. 122. – № 9. – P. 651-671. – Doi: 10.1248/yakushi.122.651.

151. Kerry, R. G. Probiotics: The Ultimate Nutritional Supplement / R. G. Kerry // *Microbial Biotechnology (Application in Food and Pharmacology)*. – 2018. – Vol. 1. – № 7. – P. 141-152. – Doi: 10.1007/978-981-10-7140-9_7.

152. Khoruts, A. Targeting the microbiome: from probiotics to fecal microbiota transplantation / A. Khoruts // *Genome Medicine*. – 2018. – Vol. 10. – № 1. – P. 80. – Doi: 10.1186/s13073-018-0592-8.

153. Lerner, A. Potential Effects of Horizontal Gene Exchange in the Human Gut / A. Lerner, T. Matthias, R. Aminov // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – № 8. – P. 1630. – Doi: 10.3389/fimmu.2017.01630.

154. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy / J. S. Bajaj, J. M. Ridlon, P. B. Hylemon [et al.] // *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2012. – Vol. 302. – № 1. – P. 168-175. – Doi: 10.1152/ajpgi.00190.2011.

155. Longitudinal multi-omics of host-microbe dynamics in prediabetes / W. Zhou, M. R. Sailani, K. Contrepois, [et al.] // *Nature*. – 2019. – № 569. – P. 663-671. – Doi: 10.1038/s41586-019-1236-x.

156. Markowiak, P. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health / P. Markowiak, K. Slizewska // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9. – № 9. – P. 1021. – Doi: 10.3390/nu9091021.

157. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhea / F. Cremonini, S. Di Caro, E. C. Nista, [et al.] // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2002. – Vol. 16. – № 8. – P. 1461-1467. – Doi: 10.1046/j.1365-2036.2002.01318.x.

158. Metabiotics: Present state, challenges and perspectives / B. A. Shenderov, A. V. Sinitsa, M. M. Zakharchenko, C. Lang // Cham: Springer International Publishing, 2020. – 123 p. – ISBN 978-3-030-34166-4. – Doi: 10.1007/978-3-030-34167-1.
159. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance / P. D. Cani, J. Amar, M. A. Iglesias, [et al.] // Diabetes. – 2007. – Vol. 56. – № 7. – P. 1761-1772. – Doi: 10.2337/db06-1491.
160. Microbiome and Allergic Diseases / M. Pascal, M. Perez-Gordo, T. Caballero, [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2018. – № 9. – P. 1584. – Doi: 10.3389/fimmu.2018.01584.
161. Microbiota and Lifestyle: A Special Focus on Diet / N. Redondo-Useros, E. Nova, N. Gonzalez-Zancada, [et al.] // Nutrients. – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 1776. – Doi: 10.3390/nu12061776.
162. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders / E. Y. Hsiao, S. W. McBride, S. Hsien, [et al.] // Cell. – 2013. – Vol. 155. – № 7. – P. 1451-1463. – Doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
163. Miyake, Y. Role of gut microbiota in liver diseases / Y. Miyake, K. Yamamoto // Hepatology Research. – 2013. – Vol. 43. – № 2. – P. 139-146. – Doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01088.x.
164. Mori, K. Does the gut microbiota trigger Hashimoto's thyroiditis? / K. Mori, Y. Nakagawa, H. Ozaki // Discovery Medicine. – 2012. – Vol. 14. – № 78. – P. 321-326.
165. Mshvildadze, M. The infant intestinal microbiome: friend or foe? / M. Mshvildadze, J. Neu // Early Human Development. – 2010. – № 1. – P. 67-71. – Doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.018.
166. Muhammad, S. A. Report: antibiotic production by thermophilic *Bacillus specie* SAT-4 / S. A. Muhammad, S. Ahmad, A. Hameed // Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2009. – Vol. 22. – № 3. – P. 339-345.
167. Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease / A. Andoh, H. Kuzuoka, T. Tsujikawa, [et al.] // The Journal of Gastroenterology. – 2012. – Vol. 47. – № 12. – P. 1298-1307. – Doi: 10.1007/s00535-012-0605-0.

168. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases / J. Lloyd-Price, C. Arze, A. N. Ananthakrishnan [et al.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 569. – № 7758. – P. 655-662. – Doi: 10.1038/s41586-019-1237-9.
169. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus* / C. Munimbazi, L. B. Bullerman // *Mycopathologia*. – 1998. – Vol. 140. – № 3. – P. 163-169. – Doi: 10.1023/a:1006832827266.
170. Nelson, K. E. *Metagenomics of the Human Body* / K. E. Nelson // New York: Springer, L. Dordrecht Heidelberg, 2011. – 351 p. – ISBN 978-1-4419-7088-6. – Doi: 10.1007/978-1-4419-7089-3.
171. Neu, J. Necrotizing enterocolitis / J. Neu, W. A. Walker // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 364. – № 3. – P. 255-264. – Doi: 10.1056/NEJMra1005408.
172. Niehus, R. Early medical history of children with autism spectrum disorders / R. Niehus, C. Lord // *The Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*. – 2006. – Vol. 27. – № 2. – P. 120-127. – Doi: 10.1097/00004703-200604002-00010.
173. Nissle, A. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien / A. Nissle // *Medizin Klinische*. – 1918. – № 2. – P. 29-30.
174. O'Toole, G. A. Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // *The Annual Review of Microbiology*. – 1999. – № 54. – P. 49-79.
175. Obesity alters gut microbial ecology / R. E. Ley, F. Backhed, P. Turnbaugh, [et al.] // *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – № 31. – P. 11070-11075. – Doi: 10.1073/pnas.0504978102.
176. Orchestration of Obesolytic Activity of Microbiome: Metabiotics at Centre Stage / B. Kapoor, A. Singh, M. Gulati, [et al.] // *Current Drug Metabolism*. – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 90-98. – Doi: 10.2174/1389200223666220211095024.
177. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut / P. S. La Rosa, B. B. Warner, Y. Zhou, [et al.] // *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 34. – P. 12522-12527. – Doi: 10.1073/pnas.1409497111.

178. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features / N. Zmora, G. Zilberman-Schapira, J. Suez, [et al.] // *Cell*. – 2018. – Vol. 174. – № 6. – P. 1388-1405. – Doi: 10.1016/j.cell.2018.08.041.

179. Postbiotics – A Step Beyond Pre- and Probiotics / J. Zolkiewicz, A. Marzec, M. Ruszczynski, W. Feleszko // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12. – № 8. – P. 2189. – Doi: 10.3390/nu12082189.

180. Potential role of Demodex mites and bacteria in the induction of rosacea / S. Jarmuda, N. O'Reilly, R. Zaba, [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2012. – Vol. 61. – № 11. – P. 1504-1510. – Doi: 10.1099/jmm.0.048090-0.

181. Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity / L. Vitetta, S. Coulson, M. Thomsen, [et al.] // *Gut Microbes*. – 2017. – Vol. 8. – № 4. – P. 311-322. – Doi: 10.1080/19490976.2017.1279379.

182. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics / M. K. Yadav, I. Kumari, B. Singh, [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – № 106. – P. 505-521. – Doi: 10.1007/s00253-021-11646-8.

183. Probiotics, prebiotics, and synbiotics regulate the intestinal microbiota differentially and restore the relative abundance of specific gut microorganisms / L. Chen, N. Zhihua, Z. Meijuan, [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2020. – Vol. 103. – № 7. – P. 5816-5829. – Doi: 10.3168/jds.2019-18003.

184. Probiotics: Their Potential to Impact Human Health / M. E. Sanders, G. Gibson, S. G. Harsharnjit, F. Guarner // *CAST Issue Paper*. – 2007. – № 36. – P. 1-20.

185. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne / S. Fitz-Gibbon, S. Tomida, B. H. Chiu, [et al.] // *The Journal of Investigative Dermatology*. – 2013. – Vol. 133. – № 9. – P. 2152-2160. – Doi: 10.1038/jid.2013.21.

186. Rahman, M. S. Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14 / M. S. Rahman, T. Ano, M. Shoda // *The Journal*

of Biotechnology. – 2006. – Vol. 125. – № 4. – P. 513-515. – Doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.016.

187. Reenen, C. A. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review / C. A. Reenen, L. M. Dicks // Archives of Microbiology. – 2011. – Vol. 193. – № 3. – P. 157-168. – Doi: 10.1007/s00203-010-0668-3.

188. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora / Q. Ma, Y. Li, P. Li, [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2019. – № 117. – P. 109138. – Doi: 10.1016/j.biopha.2019.109138.

189. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers / L. Chatelier, E. Nielsen, T. J. Qin, [et al.] // Nature. – 2013. – № 500. – P. 541-546. – Doi: 10.1038/nature12506.

190. Rogers, M. The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome / M. Rogers, D. M. Aronoff // Clinical Microbiology and Infectious. – 2016. – Vol. 22. – № 2. – P. 178.e1-178.e9. – Doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.003.

191. Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype / L. Belmonte, S. Beutheu Youmba, N. Bertiaux-Vandaële, [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – № 8. – P. e42777. – Doi: 10.1371/journal.pone.0042777.

192. Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition / J. Schrezenmeir, M. de Vrese // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – Vol. 73. – № 2. – P. 361-364. – Doi: 10.1093/ajcn/73.2.361s.

193. Schwabe, R. F. The microbiome and cancer / R. F. Schwabe, C. Jobin // Nature Reviews Cancer. – 2013. – Vol. 13. – № 11. – P. 800-812. – Doi: 10.1038/nrc3610.

194. Screening the PRISM Library against *Staphylococcus aureus* Reveals a Sesquiterpene Lactone from *Liriodendron tulipifera* with Inhibitory Activity / R. D Kirk, M. E Rosario, N. Oblie, [et al.] // ACS Omega. – 2022. – Vol. 7. – № 40. – P. 35677-35685. – Doi: 10.1021/acsomega.2c03539.

195. Secretome of Intestinal *Bacilli*: A Natural Guard against Pathologies / O. N. Ilinskaya, V. V. Ulyanova, D. R. Yarullina, I. G. Gataullin // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – № 8. – P. 1666. – Doi: 10.3389/fmicb.2017.01666.
196. Seekatz, A. M. *Clostridium difficile* and the microbiota / A. M. Seekatz, V. B. Young // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – Vol. 24. – № 10. – P. 4182-4189. – Doi: 10.1172/JCI72336.
197. Simon, O. Microorganisms as feed additives – Probiotics / O. Simon // *Advances in pork production*. – 2005. – № 16. – P. 161-167.
198. Sorokulova, I. Modern status and perspectives of *Bacillus* bacteria as Probiotics / I. Sorokulova // *Journal of Probiotics & Health*. – 2013. – Vol. 1. – № 4. – P. e106. – Doi: 10.4172/2329-8901.1000e106.
199. Spath, G. Total Synthesis of Mycinamicin IV as Integral Part of a Collective Approach to Macrolide Antibiotics / G. Spath, A. Furstner // *Chemistry*. – 2022. – Vol. 28. – № 11. – P. e202104400. – Doi: 10.1002/chem.202104400.
200. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome / C. Huttenhower, D. Gevers, R. Knight, [et al.] // *Nature*. – 2012. – № 486. – P. 207-214. – Doi: 10.1038/nature11234.
201. Takahashi, N. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives / N. Takahashi, B. Nyvad // *The Journal of Dental Research*. – 2011. – Vol. 90. – № 3. – P. 294-303. – Doi: 10.1177/0022034510379602.
202. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis / H. Kong, J. Oh, C. Deming, [et al.] // *Genome Research*. – 2012. – Vol. 22. – № 5. – P. 850-859. – Doi: 10.1101/gr.131029.111.
203. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world / P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. Hamady, [et al.] // *Nature*. – 2007. – № 449. – P. 804-810. – Doi:10.1038/nature06244.
204. The Integrative Human Microbiome Project / L. M. Proctor, H. H. Creasy, J. M. Fettweis, [et al.] // *Nature*. – 2019. – № 569. – P. 641-648. – Doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.

205. The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease / L. M. Proctor, H. H. Creasy, J. M. Fettweis, [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2014. – Vol. 16. – № 3. – P. 276-289. – Doi: 10.1016/j.chom.2014.08.014.
206. The Role of Gut Microbiota and Environmental Factors in Type 1 Diabetes Pathogenesis / S. Dedrick, B. Sundaresh, Q. Huang, [et al.] // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. – 2020. – № 11. – P. 78. – Doi: 10.3389/fendo.2020.00078.
207. The role of the skin microbiome in the development of allergic inflammation in atopic dermatitis / K. A. Gelezhe, A. V. Kudravnitskaya, O. A. Svitich, [et al.] // *New Armenian Medical Journal*. – 2021. – Vol. 15. – № 1. – P. 100-108.
208. The vaginal microbiome and preterm birth / J. M. Fettweis, M. G Serrano, J. P. Brooks, [et al.] // *Nature Medicine*. – 2019. – № 25. – P. 1012-1021. – Doi: 10.1038/s41591-019-0450-2.
209. Thomas, D. W. Probiotics and prebiotics in pediatrics / D. W. Thomas, F. R. Greer // *Pediatrics*. – 2010. – Vol. 126. – № 6. – P. 1217-1231. – Doi: 10.1542/peds.2010-2548.
210. Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk / Y. Sanz, M. Olivares, A. Moya-Perez, C. Agostoni // *Pediatric Research*. – 2015. – Vol. 77. – № 1–2. – P. 236-244. – Doi: 10.1038/pr.2014.170.
211. Vaginal microbiome of reproductive-age women / J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdo, [et al.] // *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 15. – № 108. – P. 4680-4687. – Doi: 10.1073/pnas.1002611107.
212. Virgin, H. W. The virome in mammalian physiology and disease / H. W. Virgin // *Cell*. – 2014. – № 157. – P. 142-150.
213. Wade, W. G. The oral microbiome in health and disease / W. G. Wade // *Pharmacological Research*. – 2013. – Vol. 69. – № 1. – P. 137-143. – Doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.006.
214. Weiss, G.A. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis / G. A. Weiss, T. Hennet // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2017. – Vol. 74. – № 16. – P. 2959-2977. – Doi: 10.1007/s00018-017-2509-x.

215. Wlodarska, M. An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases / M. Wlodarska, A. D. Kostic, R. J. Xavier // *Cell Host & Microbe*. – 2015. – Vol. 17. – № 5. – P. 577-591. – Doi: 10.1016/j.chom.2015.04.008.