

На правах рукописи



Лазарев Сергей Александрович

Исследование биологической активности метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus*

1.5.11. Микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Михайлова Наталья Александровна

Официальные оппоненты:

Припутневич Татьяна Валерьевна – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, директор

Суворов Александр Николаевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт Экспериментальной медицины», отдел молекулярной микробиологии, заведующий отделом

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «20» мая 2025 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Nelson KE et al., 2011; Ravel J et al., 2014; Proctor LM et al., 2019].

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 [Бухарин О.В. и соавт., 2012; Shenderov VA et al., 2020; Олескин А.В. и соавт., 2020].

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 [DuPont AW et al., 2011; Pascal M et al., 2018; Иванова Г.Е. и соавт., 2018; Лабинская А.С. и соавт., 2020; Dedrick S et al., 2020].

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. В отличие от традиционных пробиотиков, их использование является более эффективным и безопасным [Shenderov VA et al., 2020; Kapoor B et al., 2022; Sadeghi A et al., 2023]. 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 [Забокрицкий Н.А., 2015; Pinskaya ON et al., 2017; Jiang S et al., 2022; Iqbal S et al., 2023].

Известны штаммы *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719, обладающие широким спектром антагонистической активности [Михайлова Н.А. и соавт., 1996; Михайлова Н.А. и соавт., 2007]. 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 [Михайлова Н.А. и соавт., 2010; Abriouel H et al., 2011; Jiang S et al., 2022; Iqbal S et al., 2023;].

В настоящее время в клинической практике применяется единственный отечественный метабиотик на основе метаболитов *B. subtilis* ВКПМ №В-2335(3)З [Волков М.Ю. и соавт., 2006]. 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* (3Н и 1719). Установлено, что *B. subtilis* 3Н 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 [Михайлова Н.А. и соавт., 1996]. *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* [Михайлова Н.А. и соавт., 2007].

Характеристика штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719 указывает на их высокий пробиотический потенциал. Тем не менее, биологическая активность метаболитов, продуцируемых этими штаммами, остается неизученной.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: получить метаболиты пробиотических штаммов *B. subtilis* (3Н 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 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* 3Н и 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* 3Н и 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* ЗН и 1719 в процессе культивирования секретируют противомикробные метаболиты с цитотоксическим действием, активность которых 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. «Производство 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 исследования

Достоверность результатов подтверждена проведением достаточного объема исследований и выбором четких, 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.

Полученный в результате исследования охарактеризованный метабиотик использован в компании ООО «НПЦ» (Россия, Санкт-Петербург) в качестве компонента 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 источников: 67 отечественных и 148 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись метаболиты, полученные в результате глубинного периодического культивирования пробиотических штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719. Для определения антагонистической активности метаболитов применялись тест-штаммы: *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Staphylococcus aureus* 29213, *Proteus mirabilis* 24a, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* 927 из коллекции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Эксперимент по безвредности проводили на беспородных белых мышах одного пола, массой 14-16 г. Пробиотическое действие метаболитов при антибиотик-ассоциированном дисбиозе изучали на мышах линии BALB/c одного пола, массой 18-20 г. Лабораторные животные

получены из питомника НЦ биомедицинских технологий (филиал «Андреевка»). Протоколы экспериментов утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

В качестве референс-препарата использовали метабиотик «Бактистатин» (Регистрационное удостоверение № RU 77.99.88.003.Е.001019.03.19 от 21.03.2019 г.).

Методы исследования. Для получения исследуемых метаболитов проводили глубинное периодическое культивирование штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) в шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan, Латвия) с последующим освобождением от биомассы с помощью лабораторной центрифуги Avanti J-E (Beckman Coulter Life Sciences, США) и стерилизующей фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм («Millex», Ирландия). С целью разделения метаболитов на фракции с разным молекулярным весом использовали центрифужные концентраторы с вставкой для ультрафильтрации на 30 и 5 кДа (Merck, Германия).

Исследование противомикробной активности (ПА) проводили методом спектрофотометрии [Арзумян В.Г. и соавт., 2019], основанном на инкубировании клеток тест-штаммов с метаболитами и последующем добавлении красителя бромкрезолового пурпурного с повторной инкубацией. В течение этого процесса краситель проникает через поврежденные мембраны клеточных стенок микробов. По завершении эксперимента клеточный осадок удаляли и проводили измерение оптической плотности образца на спектрофотометре Genesys 6 (Thermo Scientific, США) при длине волны 440 нм. Антимикробную активность рассчитывали в % относительно контрольного образца, содержащего физиологический раствор.

Биопленкообразование (БПО) изучали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного полистеролового стерильного планшета [O'Toole et al., 1999]. с последующим окрашиванием образовавшихся биопленок кристалл-виолетом. Далее планшет промывали дистиллированной водой, добавляли 96 % этанол и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре «Multiskan-Ascent» (Thermo-Labsystems, Финляндия) при длине волны 690 нм. Способность к образованию биопленки выражали в условных единицах (ед), рассчитываемых с использованием коэффициента биопленкообразования – отношение оптической плотности тест-штамма к оптической плотности питательного бульона [Бекпергенова А.В., 2018].

Исследование ферментативной активности (ФА) проводили методом диффузии метаболитов в питательный агар. Для оценки протеолитических свойств в лунки, созданные на поверхности молочного агара, вносили исследуемые метаболиты и через сутки инкубирования наблюдали появление прозрачных зон гидролиза. Амилолитическую активность оценивали при добавлении метаболитов в картофельный агар. После инкубирования среду обрабатывали раствором Люголя и наблюдали образования светлых зон гидролиза.

Белковый состав метаболитов анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли, белковый маркер Cytiva RPN756E (12 – 225 kDa). Цитокино-подобные вещества (ЦПВ) в составе метаболитов определяли с помощью набора «Human Inflammation 18-Plex Kit» («Antigenix America», США) на проточном цитометре FC-500 («Beckman Coulter», США). Полученные данные анализировали с помощью программы Flow Cytomix Pro 2.3.

Низкомолекулярные соединения идентифицировали методом хромато-масс-спектрального анализа при помощи квадрупольно-времяпролетном масс-спектрометре высокого разрешения Impact II (Bruker Daltonik, Германия). Обработка спектров, идентификация компонентов и полуколичественный анализ осуществлялись с использованием программного пакета Metaboscape 4.0.4 (Bruker Daltonik, Германия).

Изучение безвредности метаболитов проводили в соответствии с методическими рекомендациями (ОФС.1.7.2.0001.15. Безопасность пробиотиков в тестах in-vivo).

Экспериментальный антибиотик-ассоциированный дисбиоз у мышей моделировали путём ежедневного внутрибрюшинного введения в течение 5 дней раствора гентамицина [Авдеева Ю.А. и соавт., 2016]. Антибиотик вводили животным после расчета необходимой дозы, основанной на рекомендованной среднесуточной дозировке для человека, с учетом межвидового переноса доз по удельной площади поверхности тела. Исследование проведено на 170 мышах. После моделирования дисбиоза было сформировано пять групп мышей, по 50 особей в каждой. Первая группа являлась контролем и включала животных, которые получали 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 интрагастрально в течение 21 дня. Мыши третьей группы получали метаболиты штамма *B. subtilis* 3Н, в четвертой – метаболиты *B. subtilis* 1719. Животным пятой группы вводили метабиотик «Бактистатин». Каждые 7 дней из всех групп выводили по 10 мышей для последующего изучения качественного и количественного состава пристеночного муцина толстого кишечника согласно методике Л.И. Кафарской и Н.А. Коршунова [Ефимов Б.А. и соавт., 2002]. 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. Идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе MALDI Biotyper Sirius RUO System (Bruker, США).

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) ± 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 $p < 0,05$.

Результаты

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

Одним из ключевых механизмов пробиотического действия бактерий *B. subtilis* являются антагонистические свойства. При получении метаболитов штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) установлено, что уровень их противомикробной активности зависит от состава питательной среды (ПС), используемой для культивирования. На основе этих данных проведена оптимизация питательной среды. Установлено, что наибольшую стимуляцию биосинтетической активности обеспечивают триптон и глюкоза как основные источники азота и углерода. Добавление неорганических соединений осуществляли с учетом анализа сред, рекомендованных для культивирования бактерий рода *Bacillus*. В результате сконструирована ПС для глубинного культивирования бактерий *B. subtilis*, 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 – 1. Далее проведена оценка противомикробной активности метаболитов на новой ПС, в сравнении со средами, используемых в производстве споровых пробиотиков (Таблицы 1, 2). Наивысшие показатели ПА (процент красителя, поглощенного убитыми клетками) отмечали у метаболитов, полученных на новой ПС в отношении всех тест-штаммов. Другие ПС, используемые в исследовании, оказывали слабое влияние на изучаемое свойства. Сконструированную среду использовали для глубинного культивирования штаммов *B. subtilis* (3Н и 1719) на последующих этапах работы.

Таблица 1 – Противомикробная активность метаболитов *B. subtilis* 3Н через 24 часа культивирования на разных ПС

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 (Критерий Манна-Уитни)					

Таблица 2 – Противомикробная активность метаболитов *B. subtilis* 1719 через 24 часа культивирования на разных ПС

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	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 (Критерий Манна-Уитни)					

Для исследования характера биосинтеза противомикробных метаболитов, штаммы *B. subtilis* культивировали в течение 48 часов, каждые 6 часов отбирали пробы и изучали ПА. В результате проведенных экспериментов установлено, что ПА метаболитов *B. subtilis* 3Н в отношении всех тест-штаммов возрастала в течение первых 30 часов культивирования. Это

подтверждается статистически значимыми различиями (критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным методом Данна) по сравнению с более ранними этапами культивирования (12, 18 и 24 ч). К 30-му часу выращивания ПА достигала следующих значений: 58,72% для *S. aureus* FDA 209P, 55,2% для *S. aureus* 29213, 40,08% для *P. mirabilis* 24a, 40,88% для *E. coli* ATCC25922 и 61,38% для *C. albicans* 927. Отсутствие статистически значимых различий активности в интервале от 30 до 48 часов свидетельствует о стабилизации противомикробного действия, что делает дальнейшее увеличение времени культивирования неэффективным. ПА метаболитов *B. subtilis* 1719 в отношении *S. aureus* FDA 209P увеличивалась в течение 30 часов культивирования, достигая 56,80%, после чего наблюдалось статистически значимое снижение активности (сравнении показателей через 30 и 48 ч выращивания). В отношении *S. aureus* 29213 и *P. mirabilis* 24a ПА также возрастала до 36 часов, достигая 50,63% и 48,84% соответственно, с последующим снижением (при сравнении показателей через 30 и 48 ч, а также 36 и 48 ч). Для *E. coli* ATCC 25922 ПА увеличивалась до 36 часов, после чего также снижалась (при сравнении показателей через 24 и 36 ч, а также 24 и 48 ч). В случае *C. albicans* 927 активность накапливалась до 36 часов, после чего наблюдалось снижение (при сравнении показателей через 30 и 42 ч, а также 36 и 42 ч). Таким образом, оптимальное время культивирования *B. subtilis* 1719 для получения метаболитов с максимальной ПА составляет 36 часов.

Исследование антимикробной активности фракций метаболитов

При проведении ультрафильтрации метаболитов с использованием центрифужных концентраторов, оснащенных мембранами с номинальным отсечением по молекулярной массе, установлено, что ПА сосредоточена во фракции с молекулярной массой менее 5 кДа. При этом ее уровень соответствовал активности нативных метаболитов. Методом хромато-масс-спектрального анализа в составе низкомолекулярной фракции, выявлено более 300 соединений. Наибольший интерес вызывали 23 вещества, которые накапливались в культуральной жидкости в процессе роста штамма *B. subtilis* 3Н. Из них удалось идентифицировать 11, включая 2 антибиотика: Мусинамицин VI – макролидный антибиотик с молекулярной массой 667,3912 Да, действующий в отношении грамположительных бактерий [Späth G et al., 2022] и Laurenobiolide с молекулярной массой 240,1149 Да – активный в отношении *S. aureus* [Kirk RD et al., 2022].

Исследование ферментативной активности метаболитов

Бактерии *B. subtilis* широко известны своей высокой ферментативной активностью. В связи с этим представляло интерес оценить протеолитические и амилолитические свойства полученных метаболитов. В результате проведенных экспериментов установлено, что метаболиты обладают выраженными протеолитическими и амилолитическими свойствами (Таблица 3). Дальнейший анализ ферментативной активности показал, что активные компоненты метаболитов сосредоточены во фракции с молекулярной массой более 30 кДа. В то же время в

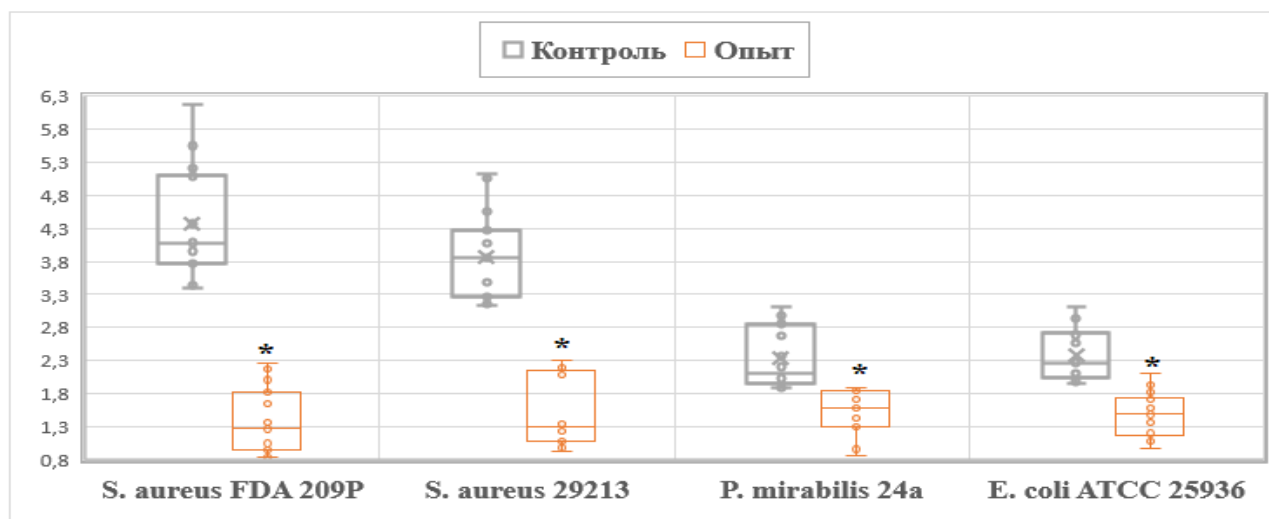
низкомолекулярных фракциях (менее 30 кДа) ферментативная активность отсутствовала. Это позволяет предположить, что ключевые ферменты, ответственные за протеолитическую и амилолитическую активность, имеют высокую молекулярную массу. При анализе белкового состава метаболитов установлено, что штамм *B. subtilis* 3Н содержит белки с молекулярными массами 31, 52 и 225 кДа, а штамм *B. subtilis* 1719 – белки с молекулярными массами 31 и 38 кДа. Наличие белков с молекулярной массой 31 кДа у обоих штаммов может указывать на присутствие общего фермента, ответственного за наблюдаемую активность. Например, белок с массой 31 кДа может быть протеазой или амилазой, характерной для *B. subtilis*. Белки с более высокой молекулярной массой (52, 225 и 38 кДа) также могут вносить вклад в ферментативную активность, так как многие ферменты, такие как субтилизины или α -амилазы, имеют схожие молекулярные массы.

Таблица 3 – Ферментативная активность метаболитов *B. subtilis*

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

Изучение влияния метаболитов на биопленкообразование условно-патогенных бактерий

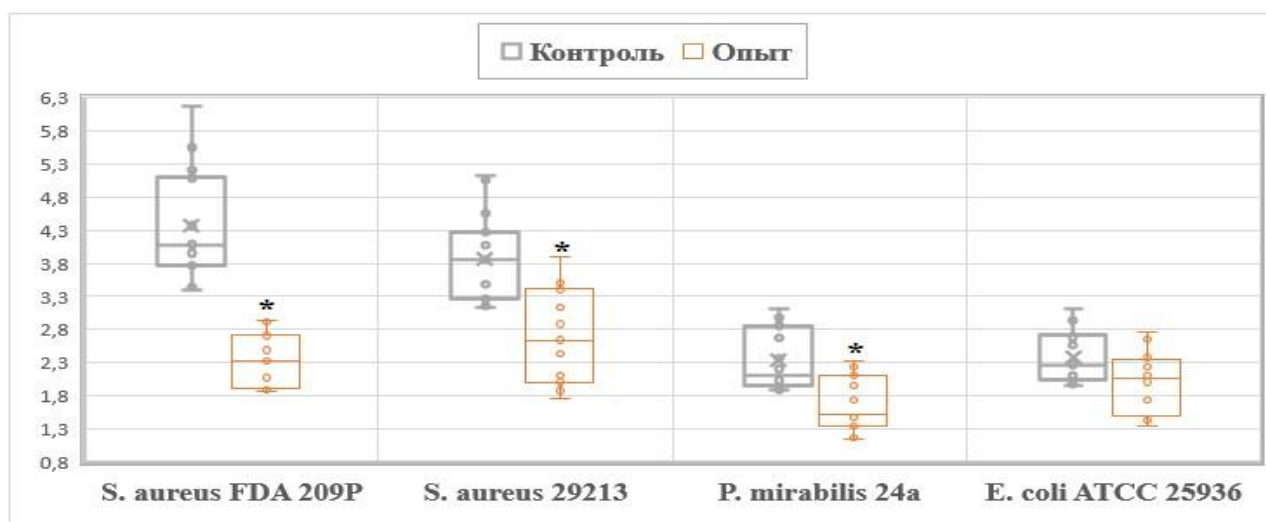
Известно, что метаболиты индигенной микробиоты способны подавлять образование биопленок условно-патогенных микроорганизмов. В связи с этим, ингибирующее действие пробиотических продуктов на процессы биопленкообразования представляет собой важный аспект их антагонистической активности. Этот эффект расширяет спектр потенциального применения пробиотиков, предлагая их в качестве альтернативного или вспомогательного средства в антимикробной терапии, что может способствовать снижению использования традиционных антибиотиков и минимизации риска развития устойчивости к ним. На основании этих данных, проведено исследование влияния полученных метаболитов на БПО. Установлено, что под воздействием метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н биопленкообразование снижалось в 3 раза у штаммов золотистого стафилококка, в 1,3 раза у протей и в 1,5 раза у кишечной палочки (Рисунок 1).



Примечание: n=15; * $p < 0,05$ — достоверность различий по сравнению с контролем (Критерий Манна-Уитни)

Рисунок 1 – Влияние метаболитов *B. subtilis* 3H на БПО тест-штаммов условно-патогенных бактерий

Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 также продемонстрировали ингибирующее действие на образование биопленки в 1,8 раза у золотистого стафилококка и в 1,4 раза у *P. mirabilis*. При этом достоверных различий между опытными и контрольными пробами штамма кишечной палочки не установили (Рисунок 2).



Примечание: n=15; * $p < 0,05$ — достоверность различий по сравнению с контролем (Критерий Манна-Уитни)

Рисунок 1 – Влияние метаболитов *B. subtilis* 1719 на БПО тест-штаммов условно-патогенных бактерий

Определение цитокиноподобных веществ в составе метаболитов

В ряде исследований продемонстрированы иммуномодулирующие свойства бактерий *B. subtilis* [Okamoto K et al., 2012; Elshaghabe F et al., 2017]. Введение сенной палочки вызывало активацию макрофагов, сопровождаемую усилением синтеза и высвобождением провоспалительных цитокинов. Механизмы, лежащие в основе активации макрофагов под

действием *B. subtilis*, продолжают изучаться. В научной литературе обсуждается вопрос о способности бактерий продуцировать вещества, подобные цитокинам [Зурочка А. В. и соавт., 2017]. Исходя из этого представляло интерес изучить состав метаболитов на наличие в них ЦПВ. В результате проведенных экспериментов в составе метаболитов *B. subtilis* 3Н обнаружены вещества, подобные провоспалительным цитокинам, таких как IL-1 β , IL-8 и IL-31. В метаболитах штамма *B. subtilis* 1719 идентифицированы относительно высокие концентрации IL-1 β , а также IL-1 α , IL-13, IL-31 и IL-33 (Таблица 4). Эти данные свидетельствуют о потенциальной способности штаммов продуцировать биологически активные молекулы, которые могут участвовать в регуляции иммунного ответа.

Таблица 4 – Концентрация ЦПВ в метаболитах *B. subtilis*

Цитокины	Концентрация (пкг/мл), Ме (Q1;Q3), n=5		
	<i>B. subtilis</i> 3Н	<i>B. subtilis</i> 1719	ПС (Контроль)
IL-1 α	0	109,55 (101,04; 112,61)	0
IL-1 β	186,43 (138,27;234,59)	1741,25 (1647,00;1835,49)	0
IL-8	6,74 (4,96;7,23)	0	0
IL-13	0	28,24 (20,42;36,06)	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

Полученные результаты открывают перспективу для дальнейшего изучения ЦПВ *B. subtilis*. В частности, вызывает интерес оценить структурно-молекулярное сходство этих соединений с цитокинами человека и их вклад в иммуномодулирующее действие данных бактерий.

Определение условий сохранения биологической активности метаболитов

Оценка стабильности биологической активности метаболитов 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 отбирали по две аликвоты для анализа их противомикробных и ферментативных свойств. Результаты исследования показали, что хранение метаболитов при температуре +5 °С в течение одного месяца приводило к значимому снижению их биологической активности. Показатели ПА уменьшились в среднем на 48%, а ФА – на 26,8% по сравнению с исходными значениями. При хранении метаболитов при температуре -18 °С ФА сохранялась на прежнем уровне, однако ПА снизилась на 17,4% через 6 месяцев хранения.

Наиболее эффективным способом хранения оказалась лиофилизация: в этом случае биологические свойства метаболитов полностью сохранялись на протяжении всего срока наблюдения (12 месяцев). Статистически значимых различий в показателях активности лиофилизированных метаболитов на 1, 6 и 12 месяцах хранения по сравнению с исходными значениями выявлено не было.

Исследование биологической активности метаболитов *Bacillus subtilis* в опытах *in vivo*

При отработке новых технологий получения пробиотических средств обязательным условием является контроль испытуемых препаратов по показателю «Безвредность» (ОФС.1.7.2.0001.15.). Введение *per os* исследуемых метаболитов 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.

Пробиотическое действие исследуемых метаболитов изучали на модели экспериментального антибиотик-ассоциированного дисбиоза толстого кишечника дисбиоза у лабораторных мышей. Дисбиоз проявлялся уменьшением и (или) исчезновением бактериальной флоры (Таблица 5). 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 5 – Количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей в условиях экспериментального дисбиоза

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов (lg КОЕ/г), M±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

Продолжение таблицы 5

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов (lg КОЕ/г), М±m, n=10	
	Группы животных	
	Контроль	Дисбиоз
<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. heyllii</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 (t-критерий Стьюдента).

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 6).

Таблица 9 – 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**	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. pneumotropicis</i>	3,7±0,39	-	-	-	4,5±0,64
<i>R. heylia</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 (t-критерий Стьюдента).

Через две недели коррекции дисбиоза у животных наблюдали устойчивую тенденцию к нормализации микробиоты (Таблица 10). 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*.

Таблица 10 – Количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после 14-дневной 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 (t-критерий Стьюдента).

На 21-ый день после окончания введения гентамицина во второй группе (дисбиоз) наблюдалась тенденция к частичному восстановлению доминантной микробиоты (Таблица 11). У мышей данной группы были обнаружены лактобациллы, представленные одним видом – *L. gasei*. Частота выявления лактозонегативных эшерихий составила 10%. У животных четвертой группы (1719) отмечали полную элиминацию бактерий *A. viridans*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые метаболиты штаммов *B. subtilis* (ЗН 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 выявлен ряд различий в нормализации микробиоты толстого кишечника мышей, обусловленный штаммоспецифическими особенностями метаболитов *B. subtilis*.

Таблица 11 – 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. heylII</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.

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.

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

– Мусциамицин 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Лазарев, С. А.** Влияние метаболитов *Bacillus subtilis* на рост и биопленкообразование *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* / **С. А. Лазарев**, Н. А. Михайлова // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета*, Москва, 11–12 марта 2020 года. – Москва: Издательство "Перо", 2020. – С. 20.
2. 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. [Scopus, RSCI], (обзор).
3. **Лазарев, С. А.** Действие метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* на биопленкообразование условно патогенных бактерий / **С. А. Лазарев**, Н. А. Михайлова // *Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы международного форума*, Москва, 28–30 октября 2020 года. Том ВЫПУСК 18. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Экспо-биохим-технологии", 2020. – С. 57-59.
4. **Лазарев, С. А.** Антагонистическая активность пробиотического штамма *Bacillus subtilis* против *Candida albicans* / **С. А. Лазарев**, Н. А. Михайлова, В. Г. Арзуманян // *Успехи медицинской микологии*. – 2021. – Т. 22. – С. 68-72.
5. **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.

6. **Lazarev S.** The Effect of Biologically Active Substances on *Bacillus subtilis* Growth and Functional activity. / **S. Lazarev**, N. Mikhailova, D. Voevodin // *KnE Life Sciences* / 8th Scientific and Practical Conference «Biotechnology: Science and Practice». – 2022. – P. 501-506.
7. **Лазарев, С. А.** Исследование безвредности метаболитов пробиотических штаммов *B. subtilis* / **С. А. Лазарев**, Н. А. Михайлова // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology*. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. Москва, 20-21 апреля 2023г / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", 2023. – С. 30.
8. 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. [RSCI, Chemical Abstracts].
9. 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.
10. **Лазарев, С. А.** Противомикробные и ферментативные свойства метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* 3Н и *Bacillus subtilis* 1719 / **С. А. Лазарев**, Н. А. Михайлова // **Иммунопатология, аллергология, инфектология**. – 2023. – №4. – С. 29-33. [RSCI].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БПО – биопленкообразование
ПА – противомикробная активность
ПС – питательная среда
ФА – ферментативная активность
ЦПВ – цитокино-подобные вещества