МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, КУЛЬТУРЫ И ИССЛЕДОВАНИЙ РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

На правах рукописи

УДК: 579.873.71+[574.36:599.323.4](043.3)

БЕРЕЗЮК ЮЛИЯ

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ac-11 И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ БИОМАССЫ НА ОРГАНИЗМ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ (КРЫС)

163.04 – МИКРОБИОЛОГИЯ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

КИШИНЕВ, 2019

Работа выполнена в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии, лаборатории Питания и Санокреатологического Пищеварения Института Физиологии и Санокреатологии, на кафедре физиологии и санокреатологии ПГУ им. Т.Г. Шевченко.

Научный руководитель:
БУРЦЕВА Светлана, доктор хабилитат биологических наук, профессор
Научный консультант:
ШЕПТИЦКИЙ Владимир, доктор хабилитат биологических наук, доцент

Специализированный Ученый Совет D 163.04-04 на базе Института Микробиологии и Биотехнологии, аккредитованный к защите диссертаций, одобренный Советом ANACEC, согласно решению № 28 от 25.01.2019, в следующем составе:

ГУДУМАК Валентин, председатель, доктор хабилитат медицинских наук, профессор
БАТЫР Людмила, ученый секретарь, доктор биологических наук, доцент
ЛЕОРДА Анна, доктор биологических наук, доцент
БАЛАН Грета, доктор биологических наук, доцент
МАКАРЬ Василий, доктор хабилитат биологических наук, профессор
КРИВОЙ Аурелия, доктор хабилитат биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:
ТИМОШКО Мария, доктор хабилитат биологических наук, профессор
РАСТИМЕШИНА Инна, доктор биологических наук, доцент

Защита состоится „30” мая 2019, в 14^{00} часов на заседании Специализированного Ученого Совета D 163.04-04 в Институте Микробиологии и Биотехнологии, г. Кишинев, ул. Академическая, 1, каб. 352.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной Научной Библиотеке АНМ им. А. Лупан и на веб-сайте www.cnaa.md

Автореферат разослан „17” апреля 2019 г.

Ученый секретарь Специализированного Ученого Совета:
БАТЫР Людмила, доктор биологических наук,
доцент _____

Научный руководитель:
БУРЦЕВА Светлана, доктор хабилитат биологических наук,
профессор _____

Научный консультант:
ШЕПТИЦКИЙ Владимир, доктор хабилитат биологических наук,
доцент _____

Автор
БЕРЕЗЮК Юлия _____

© Березюк Юлия, 2019

КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ОРИЕНТИРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность темы. Продукты микробиологического синтеза стрептомицетов используют в сельском хозяйстве в виде комплексных препаратов, дополняя основной рацион сельскохозяйственных животных, что приводит к повышению продуктивности, оптимизации метаболизма и работы иммунной системы. Кроме того, кормовые добавки, помимо питательной ценности, обладают антиоксидантными, антибактериальными, антистрессовыми, иммуномодулирующими свойствами, способствуют перевариванию корма и его всасыванию в тканях пищеварительного тракта, ингибируют развитие патогенной микрофлоры в кишечнике. Комплексные препараты, полученные на основе стрептомицетов, являются экологически безопасными, а также имеют достаточно низкую стоимость, способствуют лучшему усвоению питательных и биологически активных веществ кормов, что положительно сказывается на общей резистентности и продуктивности животных [3].

Описание ситуации в области исследования и постановка задач исследования.

Актиномицеты, в частности, род *Streptomyces,* синтезируют антибиотики, противоопухолевые средства, ферменты, гормоны, витамины, нейролептические средства, стимуляторы роста растений и животных и другие вещества, применяющиеся в фармацевтической промышленности, ветеринарии, сельском хозяйстве и других отраслях [2]. В процессе направленного синтеза веществ с антибактериальной активностью стрептомицетами образуется большое количество других метаболитов. Эти метаболиты разнообразны по химической структуре и отличаются высокой биологической активностью, что может рассматриваться как основа при разработке кормовых препаратов. Промышленное производство таких препаратов является весьма успешным, но значительное место занимают поиск, выделение, идентификация и селекция штаммов для синтеза биологически активных веществ в большом количестве, в том числе, важен поиск новых стимуляторов биосинтетической активности штаммов-продуцентов.

Проблема исследования, вытекающая из анализа ситуации в области исследования, заключается в определении биосинтетической способности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 с целью получения биомассы с высоким содержанием биологически активных веществ с последующей разработкой биопрепаратов, предназначенных для повышения интенсивности роста, плодовитости и резистентности макроорганизма к действию стрессорных факторов.

Цель исследования: изучение культуральных свойств и биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и обоснование возможности

применения его в качестве продуцента биомассы, влияющей на физиологические показатели организма теплокровных животных (крыс) в обычных физиологических условиях и при действии хронического стресса.

Для достижения поставленной цели были определены следующие ***задачи:***

1. Изучение культуральных свойств, однородности и стабильности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, его таксономической принадлежности;
2. Определение способности к накоплению биомассы и синтезу основных липидных фракций, аминокислотного и углеводного состава при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на разных средах;
3. Исследование влияния веществ цианобактериального происхождения на способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 активно накапливать биомассу и синтезировать аминокислоты, физиологически активные липидные фракции и углеводы;
4. Исследование влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на морфологические, функциональные, репродуктивные показатели организма теплокровных животных (белых крыс) в обычных физиологических условиях и в условиях хронического стресса;
5. Изучение влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на количественные характеристики отдельных представителей микрофлоры кишечника теплокровных животных (белых крыс) в обычных условиях и при действии стресс-факторов.

Методология научного исследования базируется на принципах и методах, которые широко используются в микробиологии и физиологии. Ряд показателей биосинтетической активности изучали гравиметрическими, хроматографическими и колориметрическими методами, описанными в работах [13, 22]. Антимикробные свойства изучали методом агаровых блоков [9]. Физиологические эффекты исследовали по известным методикам, описанным в работах [8, 12, 15]. Математический анализ данных был выполнен при помощи программы Microsoft Excel 2010.

Научная новизна и оригинальность. Получены новые данные о качественном и количественном составе физиологически активных липидных фракций штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Впервые выявлен эффект применения веществ цианобактериального происхождения в качестве дополнительного компонента к основной питательной среде. Обнаружено, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 способствует процессу всасывания глюкозы в тонкой кишке, увеличению прироста массы тела, облегчению выработки оборонительных условных рефлексов в условиях

хронического стрессирования, а также повышает репродуктивные показатели. Впервые выявлено, что под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 происходит увеличение количества облигатных представителей нормальной микрофлоры кишечника (*Bifidobacterium spp., Enterococcus spp.*) и снижение количества условно-патогенных бактерий (*Shigella spp., Yersinia spp., Proteus spp.*).

Решенная важная научная проблема состоит в определении биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 – продуцента биологически активных веществ, что позволяет управлять процессами увеличения количества биомассы и липидных фракций, определяя перспективу использования ее с целью улучшения функциональных и репродуктивных показателей белых крыс в условиях хронического стресса.

Теоретическая значимость работы: научно обоснована возможность увеличения количества физиологически активных липидных фракций (фосфолипиды и стерины) при использовании веществ цианобактериального происхождения в качестве стимуляторов их синтеза у актиномицетов рода *Streptomyces.* Изучены особенности влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на морфологические, функциональные, репродуктивные показатели и поведенческие характеристики белых крыс в условиях хронического стресса, что может служить основой для разработки биопрепаратов, предназначенных для повышения интенсивности роста, плодовитости и резистентности макроорганизма к действию стрессорных факторов.

Практическая значимость. Предложен штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, отличающийся высокой биосинтетической активностью в отношении накопления биомассы и синтеза физиологически активных липидных фракций; предложены новые варианты питательных сред, способствующие увеличению количества биомассы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при глубинном культивировании штамма-продуцента; полученные экспериментальные данные наметили перспективу для разработки препаратов на основе биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 для повышения адаптивных возможностей организма теплокровных животных.

Основные научные результаты, выдвинутые на защиту:

1. Выделенный из почвы Молдовы штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 отличается от других большим накоплением биомассы и липидов с повышенным количеством физиологически активных фракций (фосфолипидов и стеринов), а также антимикробной активностью по отношению к ряду тест-микроорганизмов, в том числе и фитопатогенов.

2. Добавление при культивировании *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в питательную среду соединений цианобактериального происхождения приводит к увеличению содержания в биомассе физиологически активных липидных фракций и незаменимых аминокислот.

3. Биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной питательной среде R и особенно на среде R с добавлением препарата BioR (0,1%), способствует увеличению прироста массы тела теплокровных животных как в обычных условиях, так и при стрессе.

4. Биомасса изучаемого штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 может служить основой при разработке биопрепарата для повышения резистентности организма теплокровных животных к действию стрессогенных факторов, для нормализации состава кишечной микрофлоры.

Внедрение научных результатов. Основные результаты работы внедрены в учебный процесс ЕГФ ПГУ им. Т.Г. Шевченко, а также в исследования, проводимые в НКНМ ИМБ.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Международной-практической конференции «daRostim» (Сыктывкар, 2015), Международной научно-практической конференции «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Винница, 2016), XII International scientific-applied conference “Biotechnology for agriculture and environmental protection” (Odessa, 2016), 19-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015), IV Международном медико-фармацевтическом конгрессе студентов и молодых ученых BIMCO 2017 (Черновцы, 2017), 3rd edition of International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (Chisinau, 2016).

Публикации. На основе материалов диссертации опубликовано 13 работ, из которых 5 в рецензируемых научных журналах (3 – в международных журналах, включая 2 без соавторов), 7 тезисов интернациональных конференций (4 без соавторов), 1 патент.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 119 страницах основного текста, включает 31 рисунок и 12 таблиц. Работа содержит резюме на румынском, русском, английском языках, введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, библиографию из 211 наименований и 6 приложений.

Ключевые слова: стрептомицеты, аминокислоты, липиды, углеводы, антимикробная активность, питательная среда, физиологические эффекты, белые крысы, стресс.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. СТРЕПТОМИЦЕТЫ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

Данная глава включает детальный анализ научных публикаций и синтез накопленных знаний в исследуемой области. Особое внимание было уделено вопросам, касающимся биосинтетической активности актиномицетов рода *Streptomyces*, в частности *Streptomyces fradiae*. Проанализировано действие различных факторов, влияющих на биосинтетическую активность стрептомицетов. Рассмотрены биологически активные вещества (БАВ), синтезируемые стрептомицетами, и их практическое значение.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава содержит информацию об объекте исследования – штамме *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19), выбранном в результате скрининга по способности накапливать биомассу (БМ) и липиды из 236 штаммов стрептомицетов, выделенных из почвы центральной части Молдовы. В главе описаны основные методы, применявшиеся для установления биосинтетической активности (накопление БМ, содержание в ней липидов, углеводов и аминокислот), морфо-культуральной характеристики и определения антагонистических свойств исследуемого штамма. Также приведены данные об основных методах, применявшихся при работе с лабораторными животными – белыми лабораторными крысами линии *Wistar*. Токсические свойства БМ и культуральной жидкости (КЖ) штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 оценивали с помощью методов определения острой и субхронической токсичности веществ согласно [12]. Изменение массы тела подопытных животных определяли взвешиванием. Условно-рефлекторную деятельность изучали с помощью метода выработки искусственного экстерорецепторного рефлекса [15]. Исследование изменения состава кишечной микрофлоры под влиянием БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 проводили с помощью методов получения чистой культуры, ее идентификации и количественного учета микроорганизмов данной культуры [16]. Для исследования всасывания углеводов в тонкой кишке применяли метод single-pass intestinal perfusion (SPIP) *in situ* с модификациями [8]. Также описаны методы стрессирования животных, определения фертильности самок белых крыс линии *Wistar*.

3. МОРФО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ac-11

В этой главе приводятся данные о морфо-культуральных и биосинтетических особенностях штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, полученные в результате

проведенного скрининга и оптимизации состава питательной среды с целью увеличения количества образуемой при росте штамма БМ.

Из почвенных образцов центральной части Молдовы на крахмал-аммиачном агаре были выделены 236 штаммов микроорганизмов. После посева на минеральные среды нами были определены культуральные признаки по общепринятым методикам [7, 9-11]. Полученные результаты позволили отнести изученные штаммы к роду *Streptomyces* [11].

Для изучения продуктивности штаммов при разных условиях роста были проведены опыты по культивированию их на питательных средах, отличающихся по составу. Выявлено, что наибольшее количество БМ образуется при росте на комплексных средах (R и М-1): накопление БМ больше в 2-3 раза, чем на синтетических средах Чапека и Дюлоне. Было обнаружено, что самое низкое содержание БМ при росте на комплексных питательных средах было при культивировании у *Streptomyces spp*. 12 и 205 (от 3,85 до 5,60 г/л). Наибольшее содержание БМ, полученной при росте стрептомицетов на средах R и М-1, было выявлено у штаммов *Streptomyces sp*. 19 и *Streptomyces sp*. 66: от 13,46 до 14,15 г/л и от 18,72 до 19,62 г/л соответственно (Таблица 3.1).

Таблица. 3.1. Накопление БМ стрептомицетами при росте на комплексных и минеральных питательных средах, г/л абсолютно сухая биомасса (АСБ)

Среда / **Штаммы** ***Streptomyces spp.***	**М-1**	**R**	**Чапека**	**Дюлоне**
12	5,60±0,43	4,60±0,21	4,31±0,37	3,81±0,16
19	**14,15±0,21**	**13,46±0,52**	4,82±0,28	2,26±0,34
33	7,24±0,56	10,48±0,13	3,72±0,12	4,12±0,42
36	12,11±0,12	12,27±0,24	4,01±0,19	5,11±0,23
47	9,35±0,49	3,53±0,04	5,12±0,25	5,92±0,32
49	6,64±0,42	7,93±0,53	5,80±0,27	3,32±0,38
66	**19,62±0,07**	**18,72±0,14**	6,32±0,15	5,83±0,19
205	4,21±0,11	3,85±0,09	3,05±0,18	4,10±0,16

Далее была изучена способность к накоплению липидов в БМ штаммов стрептомицетов при культивировании на комплексных средах R и М-1. Было показано, что количество липидов при росте на этих средах варьирует от 1,50% до 18,69% АСБ в зависимости от штамма. Однако наиболее оптимальное соотношение продуктивности БМ и способности к липидобразованию при росте на комплексных средах выявлено у штамма *Streptomyces sp.* 19. Содержание липидов в БМ, полученной в результате культивирования этого штамма на комплексных средах, составило от 12,11% до 12,85% АСБ (Таблица 3.2).

Таблица. 3.2. Липидообразование стрептомицетов при культивировании на разных питательных средах, % АСБ

Среда / Штаммы *Streptomyces spp.*	**М-I**	**R**	**Чапека**	**Дюлоне**
12	12,10±0,40	5,02±0,90	7,70±0,30	6,83±0,14
19	**12,11±0,27**	**12,85±0,55**	6,32±0,41	4,91±0,65
33	6,32±0,38	8,73±0,25	8,36±0,54	5,87±0,27
36	5,92±0,44	12,81±0,32	12,61±0,11	9,32±0,50
47	14,30±0,30	18,69±0,87	8,34±0,43	7,32±0,37
49	13,51±0,17	11,41±0,50	9,31±0,45	8,42±0,20
66	6,74±0,48	7,11±0,43	10,81±0,39	8,94±0,29
205	2,22±0,15	1,50±0,26	4,35±0,32	3,12±0,18

В ходе опытов замечено, что среди штаммов *Streptomyces spp.* наибольшее количество БМ и липидов образует штамм *Streptomyces sp.* 19 при культивировании на комплексных питательных средах (R и М-1). Повышенное содержание липидов предполагает увеличенное количество физиологически активных липидных фракций в них. Поэтому было проведено определение фракционного состава липидов БМ штамма *Streptomyces sp.* 19 при росте на комплексных средах. Было показано, что количество таких физиологически активных фракций, как фосфолипиды (ФЛ) и стерины (СТ), было наибольшим при культивировании штамма *Streptomyces sp.* 19 на комплексной среде R (19,34% и 12,14% от суммы липидов соответственно). Содержание ФЛ и СТ в БМ штамма при росте на среде М-1 ниже: 13,80% и 11,30% от суммы липидов соответственно.

Поскольку штамм *Streptomyces sp.* 19 при росте на среде R показал самое высокое содержание БМ и липидов с наибольшей концентрацией липидных фракций, далее изучали состав БМ штамма, полученного на комплексной среде R, содержащей в качестве основных источников углерода и азота крахмал, кукурузную муку и нитрат аммония. Количество углеводной фракции составило 21,6% от общего количества БМ.

Исследование такого важного показателя, как белковый и аминокислотный состав БМ и КЖ штамма *Streptomyces sp.* 19, культивированного на среде R, показало, что количество белка в БМ составило около 300,0 мг/г. Содержание незаменимых аминокислот доходило до 33,0%, а иммуноактивных – около 62,0% от общего количества. Можно также упомянуть высокое количество глутаминовой кислоты, составившее около 85 мг/г или 29,0% от суммы аминокислот, и аланина, количество которого составило 36 мг/г или 12,0% от общего количества белка (Таблица 3.3).

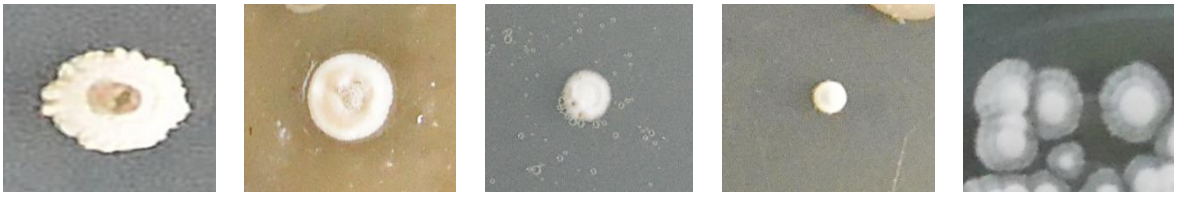
Таблица 3.3. Содержание аминокислот в БМ и КЖ *Streptomyces sp*. 19 при росте на среде R

Сумма аминокислот	**БМ, мг/г**	**КЖ, мг/л**
Σ аминокислот	291,1±3,1	81,1±1,0
Σ заменимых аминокислот	189,3±0,8	46,9±0,3
Σ незаменимых аминокислот	96,8±0,2	24,9±0,1
Σ иммуноактивных аминокислот	179,3±0,7	17,2±0,2
Σ гликогенных аминокислот	99,8±1,8	7,5±0,1
Σ кетогенных аминокислот	57,2±0,2	22,8±0,2
Σ протеиногенных аминокислот	286,1±0,2	71,8±0,3
Σ серосодержащих аминокислот	14,5±1,2	5,3±0,1

В результате скрининга было обнаружено, что наибольшее количество БМ и общих липидов, а также физиологически активных фракций (ФЛ и СТ) наблюдается у штамма *Streptomyces sp*. 19 при росте на среде R. У этого штамма определено количество белка и углеводов в биомассе.

Изучение морфо-культуральных свойств штамма *Streptomyces sp.* 19 показало, что штамм формирует колонии, в основном, плотные, шероховатые, с каплевидным профилем и развитым воздушным мицелием. При росте на агаризованных средах *Streptomyces sp.* 19 образует: воздушный мицелий – мелово-белый, белый (при росте на всех средах), зеленовато-серый (среда Чапека); субстратный мицелий имеет желтоватые оттенки при росте на средах Гаузе, овсяный агар (ОА), СР-1, мраморно-розовый цвет – на среде Чапека, кожано-бурый – на среде Придхема-Готтлиба (ПГ). Диффузии растворимого пигмента в агар-агар нет.

При росте *Streptomyces sp.* 19 на среде Чапека форма колоний неправильная, наблюдается слабый рост. Культивирование штамма на среде ОА показало хороший рост колоний круглой формы с гладкими фестончатыми краями. При росте на среде Гаузе колонии круглые с гладким краем и морщинистой поверхностью. На среде ПГ был отмечен слабый рост колоний круглой формы с валиком по краю. При росте на среде СР-1 отмечен хороший рост колоний круглой формы с реснитчатым краем (Рисунок 3.1).



a) **b)** **c)** **d)** **e)**

Рис. 3.1. Колония *Streptomyces sp.* 19 при росте на среде Чапека (**a**), ОА (**b**), Гаузе (**c**), ПГ (**d**) и СР-1 (**e**)

Проверка на морфо-культуральную однородность штамма *Streptomyces sp.* 19 на вышеупомянутых стандартных агаризованных средах показала, что популяция изучаемого штамма гомогенна.

На основании исследования морфо-культурных и физиолого-биохимических особенностей штамм *Streptomyces sp.* 19 идентифицировали как *Streptomyces fradiae* и депонировали в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов ИМБ как *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Помимо изучения морфо-культуральных и биосинтетических свойств исследовали антагонистические способности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, используя метод агаровых блоков [9]. Степень активности штамма оценивали по шкале Биргер [17]. Обнаружено, что к метаболитам штамма чувствительны *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*, а у *Candida albicans* выявлена высокая чувствительность (Таблица 3.4).

Таблица 3.4. Антимикробная активность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на разных средах

Среда культивирования, антибиотик	**Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм**				
	Escherichia coli	***Enterococcus faecalis***	***Staphylococcus aureus***	***Candida albicans***	***Pseudomonas aeruginosa***
Среда Чапека	0	0	19,0±2,3	35,0±3,4	10,0±0,1
Среда Гаузе	0	16,0±3,0	20,0±0,1	П.п.	0
Среда R	0	13,5±2,0	18,0±0,2	31,0±0,1	9,5±0,1
Стрептомицин (10 µg/диск)	20,0±1,1	0	20,0±0,1	0	0
Гентамицин (10 µg/диск)	24,0±0,2	0	31,0±3,0	0	37,0±4,1
Тетрациклин (30 µg/диск)	15,0±2,3	0	30,0±1,1	0	0
Нистатин (80 µg/диск)	0	0	0	23,0±4,1	0
Неомицин (30 µg/диск)	17,0±1,7	0	0	0	22,0±2,7
Тилозин (15 µg/диск)	0	21,0±2,0	28,0±1,7	0	0

Примечание: П.п. – полное подавление.

Изучение действия метаболитов штамма на фитопатогенные микроорганизмы показало, что к нему высоко чувствителен часто встречающийся в Молдове фитопатоген *Xanthomonas campestris* (диаметр зоны задержки роста – 24,5–32,0 мм) [17].

Для увеличения содержания БМ и биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 культивировали его на питательной среде с добавлением двух соединений – экстракта аминокислот и олигопептидов (BioR) и сульфатированных полисахаридов с Zn ($СПС_{Zn}$), полученных из БМ цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis*, в разных концентрациях [1].

Наибольшее количество БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 наблюдалось при добавлении BioR в концентрации 0,05% – 0,1% (15,21 г/л и 15,88 г/л соответственно). Наиболее эффективным в отношении накопления БМ штаммом оказалось добавление к основной питательной среде R BioR в концентрации 0,1%. Использование $СПС_{Zn}$ в концентрации до 20% оказывает стимулирующее влияние на количество БМ, а более высокие концентрации приводят к его снижению. Исследование содержания липидов в БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при росте на измененной среде R обнаружило уменьшение их количества в БМ штамма (Таблица 3.5).

Таблица 3.5. Накопление БМ и липидов штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на измененной комплексной среде R

Питательная среда	**Количество БМ**		**Содержание липидов в АСБ**	
	г/л	**% к контролю**	**%**	**% к контролю**
Среда R	13,46±0,52	100,00±0,01	12,85±0,55	100,00±0,01
Среда R+0,05% BioR	15,21±0,66	113,01±9,90	10,69±0,21	83,19±25,75
Среда R+0,1% BioR	**15,88±0,44**	**118,17±8,71**	12,28±0,41	95,57±12,75
Среда R+1% BioR	15,48±0,20	115,27±6,62	8,15±0,61	63,39±7,06
Среда R+2% BioR	14,94±0,62	111,15±9,80	7,56±0,79	58,84±8,64
Среда R+5% BioR	14,27±0,99	106,10±3,68	7,30±0,16	56,78±8,40
Среда R+5% $СПС_{Zn}$	14,54±0,23	108,48±3,27	10,51±2,63	81,76±23,76
Среда R+10% $СПС_{Zn}$	15,08±0,27	112,12±5,25	10,18±0,65	79,21±4,82
Среда R+20% $СПС_{Zn}$	13,73±0,41	102,02±4,93	10,52±1,51	81,83±14,51
Среда R+30% $СПС_{Zn}$	12,38±0,22	91,76±1,54	12,63±2,48	98,31±23,25
Среда R+50% $СПС_{Zn}$	11,84±0,48	88,21±12,89	10,12±1,93	78,76±17,38

Изучение фракционного состава липидов впервые выявило, что при добавлении в комплексную среду R препарата $СПС_{Zn}$ в концентрации 30,0% увеличение количества СТ составило 136,7% по сравнению с контролем. Добавление в среду R BioR в концентрации 0,1% привело к повышению количества фракции стеринов на 55,2% по отношению к контролю.

Последующие исследования были направлены на изучение содержания белка и углеводов в БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на среде R с добавлением BioR в концентрации 0,1% и $СПС_{Zn}$ в концентрации 30,0%. Было показано положительное влияние BioR на накопление белка в БМ: его количество увеличилось на 24,2% по сравнению с контролем. Добавление в питательную среду $СПС_{Zn}$ привело к снижению синтеза белка на 22,5% по сравнению с контролем (Рисунок 3.2).

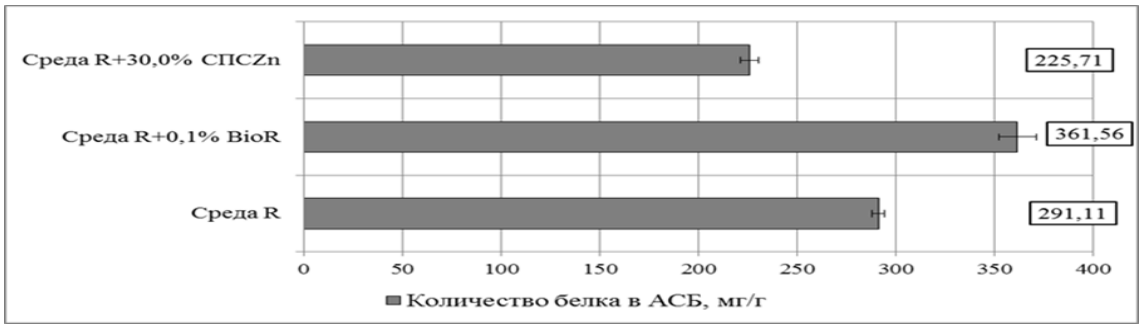


Рис. 3.2. Содержание протеина в БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на комплексной среде R с добавками

Добавление препарата BioR также оказало положительное влияние на накопление в БМ штамма отдельных аминокислот: количество треонина выросло на 109,3%, серина – на 112,1%, валина – на 102,1%, фенилаланина – на 114,5% по сравнению с контролем. Кроме того, в присутствии BioR произошло значительное увеличение незаменимых (на 78,2%) и серосодержащих аминокислот (на 55,5%) по сравнению с контролем. Добавление в питательную среду $СПС_{Zn}$ не повлияло на накопление отдельных аминокислот.

Определение содержания углеводов в БМ штамма показало, что их количество понизилось на 9,3% по сравнению с контролем при добавлении в питательную среду BioR и повысилось на 12,0% – при добавлении $СПС_{Zn}$ (Рисунок 3.3).

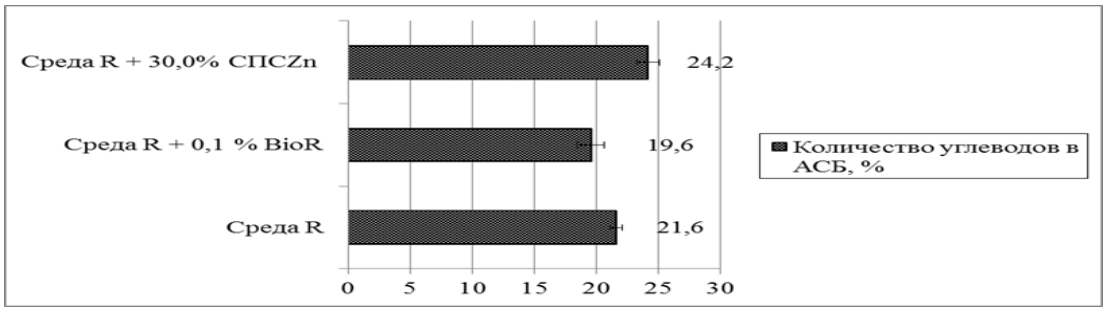


Рис. 3.3. Содержание гексозной фракции в БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с BioR и $СПС_{Zn}$

4. ДЕЙСТВИЕ БИОМАССЫ ШТАММА *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ac-11 НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОРГАНИЗМА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ (КРЫС)

В процессе направленного синтеза веществ с антибактериальной активностью стрептомицетами образуется большое количество других метаболитов, которые весьма разнообразны и характеризуются высокой биологической активностью. В связи с этим были разработаны комплексные препараты, повышающие эффективность использования

кормов и стимулирующие рост сельскохозяйственных животных и птицы. Известно, что добавление в рацион таких препаратов, как кормогризин, витамицин, биовит и пр., которые являются высушенной мицелиальной массой стрептомицета-продуцента или биошротами биотехнологического производства, положительно влияет на продуктивность сельскохозяйственных животных [14].

Проведенные ранее исследования показали, что БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 содержит в составе аминокислоты, в том числе незаменимые, углеводы, липиды (Таблица 4.1), а также вещества с антимикробными свойствами и другие физиологически важные соединения, что имеет значение при рассмотрении возможности применения данной БМ в качестве основы биопрепарата.

Таблица 4.1. Состав БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в зависимости от состава среды культивирования

Компоненты БМ	**Среда R**	**Среда R+0,1% BioR**
Липиды, % АСБ	12,85	12,21
Фосфолипиды, % от суммы липидов	19,34	19,93
Стерины, % от суммы липидов	12,14	18,84
Триглицериды, % от суммы липидов	18,67	14,29
Белки, мг/г	291,10	361,56
Незаменимые аминокислоты, мг/г	96,82	172,54
Иммуноактивные аминокислоты, мг/г	179,35	204,80
Серосодержащие аминокислоты, мг/г	14,52	22,60
Углеводы, % АСБ	21,60	19,60

На начальном этапе исследования влияния на различные показатели организма теплокровных животных (крыс) БМ и КЖ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на средах разного состава, была проведена оценка их острой и субхронической токсичности. Оценку острой токсичности КЖ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 проводили на 72 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar* путем однократного внутрижелудочного введения культуральной жидкости в разных дозах. АСБ в дозе от 50 до 400 мг/кг массы тела с интервалом в 50 мг/кг разводили водой и вводили однократно внутрижелудочно. В течение эксперимента смертельных исходов не наблюдалось, не было и изменений во внешнем виде и поведении. Субхроническую токсичность БМ штамма изучали на 48 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar*. Обнаружено, что применение БМ в трехкратной терапевтической дозе не оказало отрицательного влияния на общее состояние опытных животных. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии токсического влияния БМ и КЖ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на организм и функциональные возможности животных.

Далее исследовали влияние БМ и КЖ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на изменение массы тела. Применяли сухую БМ и КЖ как добавку к основному рациону в дозе: БМ – 250 мг/кг, КЖ – 12 мл/кг. Обнаружено, что в обычных физиологических условиях добавление к основному рациону белых крыс БМ, в отличие от КЖ, привело к увеличению массы их тела. На заключительном этапе опыта (9-12 неделя) животные, получавшие БМ, весили на 23-26 % больше по сравнению с контрольными (Рисунок 4.1).

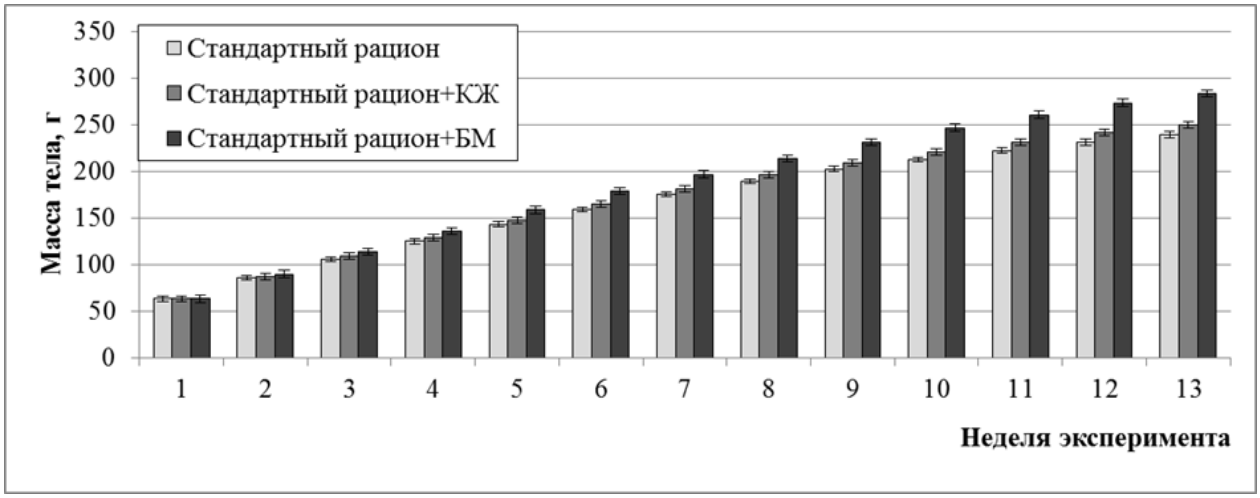


Рис. 4.1. Динамика массы тела белых крыс при добавлении в стандартный рацион БМ и КЖ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в обычных физиологических условиях

Для изучения влияния БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на организм в условиях действия стресс-факторов были смоделированы такие разновидности стресса, как тепловой и иммобилизационный. Опыты показали, что животные, получавшие стандартный рацион питания и подвергавшиеся воздействию теплового стресса (помещение опытных животных в термостат при температуре +34+36°С в течение 2 часов), потеряли в весе, тогда как у крыс, получавших БМ исследуемого штамма, наблюдалось повышение массы тела. Аналогичные результаты получены при проведении иммобилизационного стрессирования подопытных животных – фиксация животных на спинке с привязанными лапками на 2 часа.

В процессе исследования влияния длительного потребления БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (в дозе 250 мг/кг массы) на процесс выработки оборонительных условных рефлексов у белых крыс разного возраста было обнаружено, что у молодых крыс (в возрасте 4-х месяцев) число условно-рефлекторных реакций существенно возросло по сравнению с животными контрольной группы (в 2–5 раз), также

применение БМ в качестве пищевой добавки способствовало более раннему достижению 100,0%-го уровня выработки условных рефлексов (на 10-й день) (Рисунок 4.2).

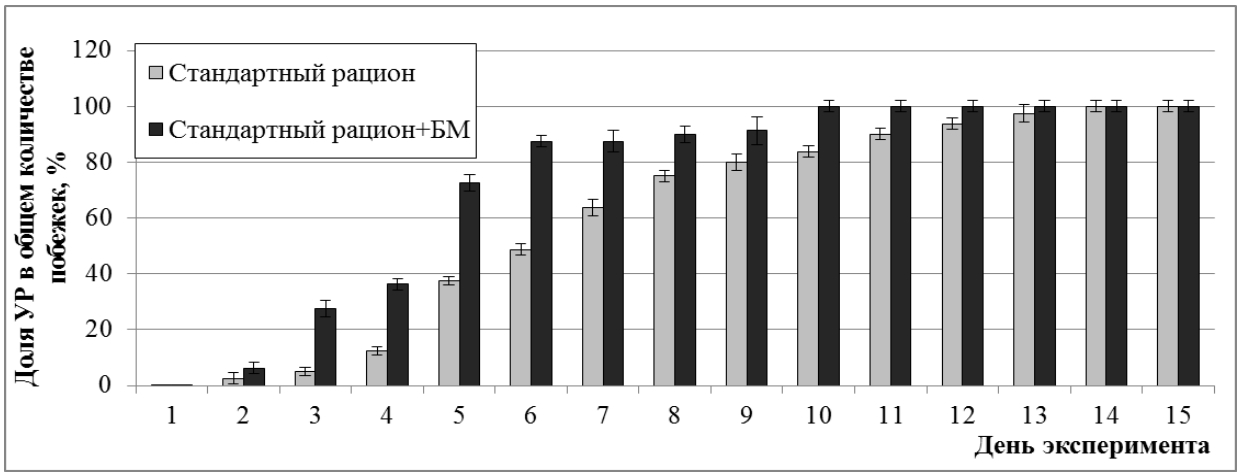


Рис. 4.2. Динамика условно-рефлекторной деятельности молодых крыс под влиянием длительного потребления БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11

Потребление старыми животными, начиная с 13-ти месячного возраста, в течение 90 дней БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 способствовало существенному увеличению у них числа условно-рефлекторных реакций практически на всем протяжении эксперимента. В отличие от старых животных контрольной группы, у которых максимальный уровень выработки условных рефлексов не превысил 61,0%, у крыс, получавших в качестве пищевой добавки БМ исследуемого штамма, этот показатель составил более 82,0%. При сравнении результатов эффективности БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, полученных на молодых и старых животных, выявлено, что у старых крыс действие БМ в отношении условно-рефлекторной деятельности более выражено.

Ранее нами была получена БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR (БМ2) (Таблица 4.1, стр. 14). Для изучения влияния полученной БМ2 на организм животных добавляли ее к основному рациону питания опытных животных в дозе 250 мг/кг массы.

Изучение влияния БМ2 на привесы экспериментальных животных показало, что ее применение положительно повлияло на прирост массы тела в обычных условиях. К 9–12-ой неделе опытные животные весили больше крыс контрольной группы на 30,0–33,0% (Рисунок 4.3). Следует отметить, что эффективность БМ2 штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в отношении массы тела несколько выше, чем БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на среде R.

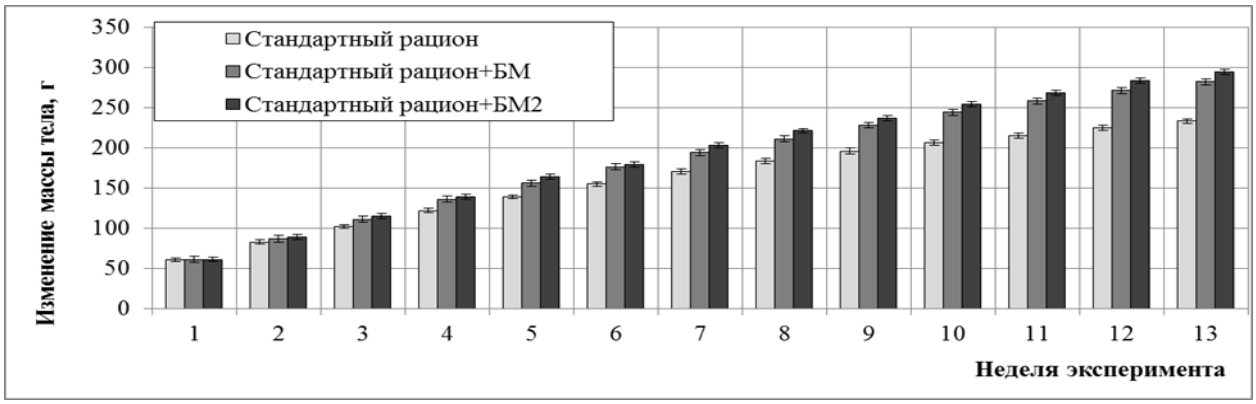


Рис. 4.3. Динамика массы тела белых крыс при применении БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением BioR (БМ2), в обычных физиологических условиях

При исследовании влияния БМ2 на организм во время действия хронического стрессорного фактора было обнаружено, что животные со стандартным рационом питания потеряли в весе, а у крыс, получавших БМ2 в качестве добавки к основному рациону, наблюдалось повышение массы тела в течение стрессового периода (Рисунок 4.4).

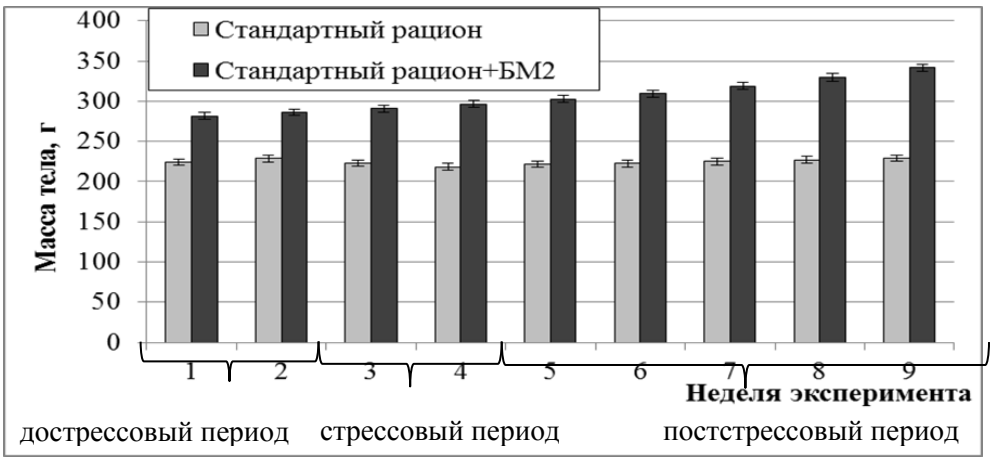


Рис. 4.4. Динамика прироста массы тела белых крыс при скармливании БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на среде R с добавлением BioR (БМ2), при действии стресса

Опыты, направленные на исследование влияния длительного потребления БМ2 на процесс выработки оборонительных условных рефлексов у белых крыс, обнаружили, что у крыс, получавших в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания БМ2, количество условно-рефлекторных реакций намного выше, особенно в первые дни, чем у животных контрольной группы, получавших обычный корм. Сравнительный анализ эффективности БМ и БМ2 штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в отношении

условно-рефлекторной деятельности свидетельствует, что вторая более эффективна лишь на начальном этапе обучения (2–4 сутки), эффективность первой существенно выше на последующем и особенно заключительном этапе обучения.

Далее изучали влияние БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной питательной среде R, на фертильность, кишечную микрофлору и всасывание углеводов у подопытных животных. Изменение фертильности экспериментальных животных под влиянием БМ исследуемого штамма исследовали следующим образом: к самкам контрольной и опытной групп подсаживали самцов соответствующей группы опыта (в соотношении 2:1) на 2-е недели. В течение спаривания и беременности животные опытных групп получали к основному рациону питания БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Фиксировали дату родов, количество крысят в помете и массу тела новорожденных крысят в опытной и контрольной группах.

Обнаружено, что применение БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в качестве добавки к основному рациону до, во время и после беременности не оказало отрицательного влияния на организм животных и их потомства и способствовало увеличению количества родившихся крысят на 1 самку в опытных группах, индекс плодовитости вырос на 35,5% по сравнению с показателями контрольных животных (Таблица 4.2).

Таблица. 4.2. Показатели постнатального развития крысят при изучении влияния БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на репродуктивную функцию крыс

Исследуемые показатели	**Группы животных**	
	Контрольная (стандартный рацион питания)	**Опытная (стандартный рацион питания+БМ)**
Количество новорожденных крысят на одну самку, абс.	8,00±3,81	11,33±0,65
Индекс плодовитости, % к контролю	100,0±0,01	135,50±7,85
Постнатальная смертность крысят через 3 недели, %	7,07±3,07	0

Следующим этапом исследований было изучение процессов всасывания пищевых веществ в тонкой кишке под влиянием БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, т.к. всасывание является необходимой составляющей сложного процесса питания, обеспечивающего морфологические и биохимические процессы в организме. Ранее было установлено, что процесс всасывания пищевых веществ в тонкой кишке весьма

чувствителен к воздействию стрессовых факторов и нарушается в условиях хронического стрессирования [4].

Исследования показали, что длительное кормление экспериментальных животных кормом с добавлением БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 способствовало частичной нормализации всасывания активно транспортируемых нутриентов (глюкозы) в тонкой кишке в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Исследование изменения количества отдельных представителей кишечной микрофлоры при добавлении в корм опытным животным БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 выявило, что содержание *Bifidobacterium spp*. увеличилось уже на 3-й день кормления на 18,0% и возросло до 119,0% при длительном потреблении БМ по сравнению с контролем. Количество *Lactobacillus spp.* и *Escherichia coli* практически не изменилось. Содержание *Enterococcus spp*. возросло при длительном применении БМ, составив 139,0% по сравнению с контролем. Количество *Candida spp*., *Yersinia spp*., *Shigella spp*. и особенно плесневых грибков снизилось в результате длительного потребления БМ, содержание *Proteus spp.*, в отличие от этого, несколько повысилось (Рисунок 4.5).

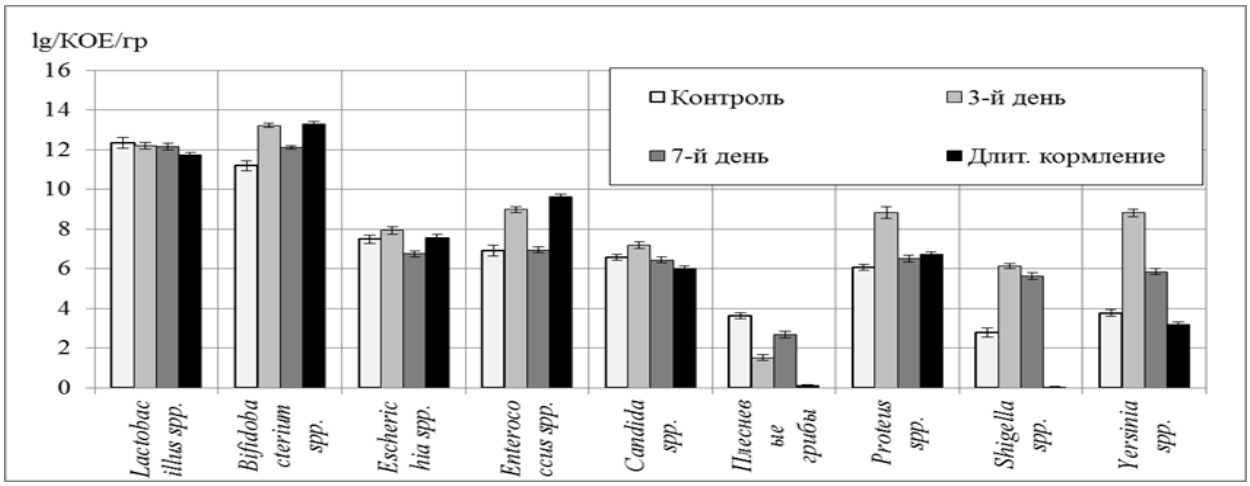


Рис. 4.5. Изменение микрофлоры кишечника при кормлении БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в обычных условиях

Для исследования влияния БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на отдельных представителей микрофлоры кишечника при стрессе животные подвергались действию стрессорных факторов в течение 2-х недель, далее следовал восстановительный период. Предварительно в течение 3-х месяцев, а также в течение эксперимента вместе с кормом животные получали БМ. Опыты показали, что в условиях хронического стрессирования уменьшилось количество облигатных микроорганизмов и увеличилось количество условно-патогенных бактерий. Под влиянием длительного потребления БМ

штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 наблюдалось увеличение количества *Bifidobacterium spp.* и снижение представителей условно-патогенной микрофлоры (*Shigella spp., Yersinia spp., Proteus spp.*), а также плесневых грибков по сравнению со стрессированными животными, получавшими обычный рацион (Рисунок 4.6).

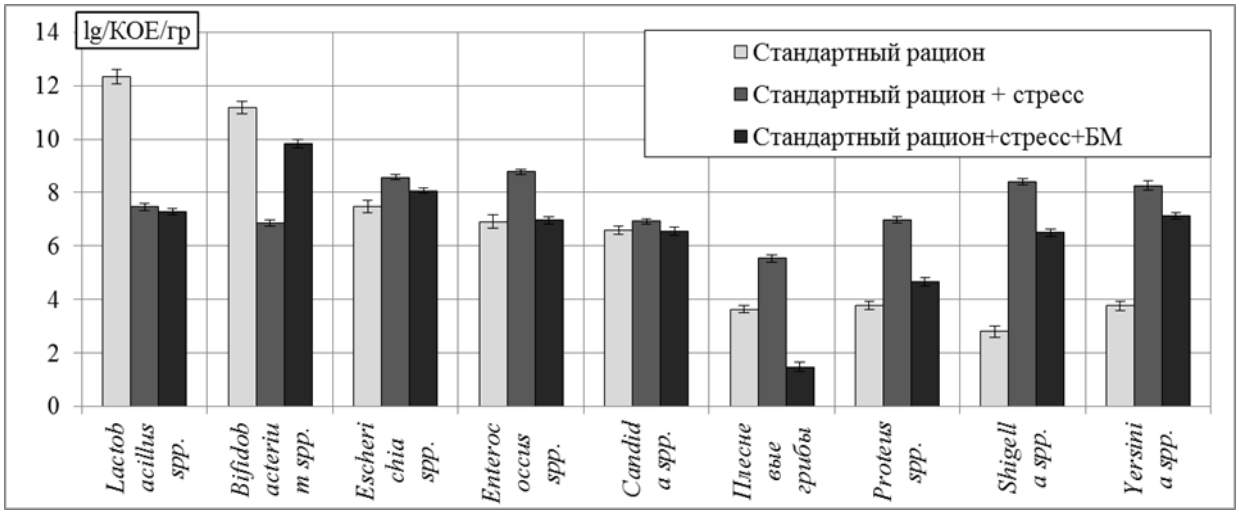


Рис. 4.6. Изменение микрофлоры кишечника под действием БМ штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при иммобилизационном стрессе

Проведенные исследования по изучению влияния теплового стресса на отдельных представителей микрофлоры кишечника выявили изменения, схожие с изменениями состава бактериоценоза, полученными в результате 2-недельного иммобилизационного стрессирования, но менее выраженные.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

Проведение исследований и анализ результатов, полученных в рамках докторской диссертации **«Биосинтетические свойства *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и физиологические эффекты биомассы на организм теплокровных животных (крыс)»,** привели к следующим выводам:

1. Изучаемый штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 отличается увеличенным количеством образуемой биомассы (13,46 – 14,15 г/л) и содержанием в ней липидов (12,11% – 12,85% АСБ), особенно физиологически активных липидных фракций (фосфолипиды: 13,80 – 19,34%, и стерины: 12,11 – 12,14% от суммы липидов) [21].

2. Изучены морфо-культуральные и биохимические свойства штамма. Выявлены свойства, отличающие его от ранее известных коллекционных штаммов этого вида. Проверка на однородность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на стандартных агаризованных средах показала, что популяция изучаемого штамма гомогенна.

3. Выявлена различная степень активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 против 11 из 13 бактериальных и грибковых тест-культур. Обнаружена высокая антимикробная активность по отношению к условно-патогенным микроорганизмам *Staphylococcus aureus, Candida albicans,* а также к фитопатогенным бактериям *Xanthomonas campestris* [19].

4. Оптимизация среды культивирования путем добавления к комплексной среде R препарата цианобактериальной природы BioR в концентрации 0,1% приводит к увеличению количества биомассы (до 15,88 г/л), фосфолипидов (до 19,93% от суммы липидов), стеринов (до 18,84% от суммы липидов), белков (361,56 мг/г) и аминокислот: иммуноактивных (204,80 мг/г) и незаменимых (172,54 мг/г) [20].

5. Биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при добавлении в корм экспериментальным животным способствует увеличению прироста массы их тела в обычных физиологических условиях (на 23,0–26,0%) и при действии стрессорных факторов, интенсификации процессов всасывания отдельных пищевых веществ в тонкой кишке, облегчению процесса обучения и повышению плодовитости на 35,5%. Добавление в корм биомассы, полученной при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на основной питательной среде R с BioR (0,1%), в обычных условиях приводит к более значимому приросту массы тела (на 30,0–33,0%) [5, 18].

6. При длительном потреблении (90 суток) экспериментальными животными биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 отмечается увеличение количества облигатных представителей нормальной микрофлоры кишечника (*Bifidobacterium spp., Enterococcus spp.*) и снижение количества условно-патогенных бактерий (*Shigella spp., Yersinia spp., Proteus spp.*) в обычных условиях и уменьшение дисбиотических изменений бактериоценоза кишечника в условиях длительного воздействия стрессорного фактора [6].

Решенная важная научная проблема состоит в определении биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 – продуцента биологически активных веществ, что позволяет управлять процессами увеличения количества биомассы и липидных фракций, определяя перспективу использования ее с целью улучшения функциональных и репродуктивных показателей белых крыс в условиях хронического стресса.

Личный вклад автора. Данные, отражающие содержание патента, являются частью авторского права в соответствии со списком авторов. Все остальные результаты, анализ, обобщения и выводы принадлежат автору.

Практические рекомендации

1. Для повышения накопления биомассы и содержания в ней липидов, особенно таких физиологически важных фракций, как фосфолипиды и стерины, а также незаменимых и иммуноактивных аминокислот рекомендуется вести культивирование штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на комплексной среде R с добавлением препарата цианобактериального происхождения BioR в концентрации 0,1%.

2. Для увеличения массы тела, плодовитости и стрессорезистентности теплокровных животных рекомендуется добавление в корм биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R.

Предложения на перспективу. Основные результаты диссертации представляют перспективу развития исследований, направленных на разработку комплексного биопрепарата на основе биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, способствующей увеличению прироста массы тела, плодовитости и стрессорезистентности животных, а также на определение в биомассе веществ с нейропротекторными и антиоксидантными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rudic V. şi col. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale şi realizări practice. Chişinău: Elena V.I., 2007. 365 p.
2. Бурцева С.А. Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения). Автореф. дисс. док. хаб. биол. наук. Кишинев, 2002. 35 с.
3. Фурдуй Ф.И. и др. Стресс и адаптация сельскохозяйственных животных в условиях индустриальных технологий. Кишинев: Штиинца, 1992. 223 с.
4. Шептицкий В.А., Чебан Л.И., Попану Л.В. Всасывание моносахаридов в тонкой кишке при хроническом стрессе. În: Buletinul AŞM, Ştiinţele vieţii, 2009, nr 1, p.12-19.
5. **Березюк Ю.Н**. и др. Влияние метаболитов стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы, на теплокровных животных. В: Теория, практика и перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве. Материалы XI Международной практической конференции daRostim. Сыктывкар, 2015, с. 25-26.
6. **Березюк Ю.** Влияние длительного применения биопрепарата на основе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на состав кишечной микрофлоры белых крыс. В: ХИСТ, Всеукраинский медицинский журнал молодых ученых, вып. 19. Черновцы, 2017, с. 205.
7. Бондарцев А.С. Шкала цветов. Москва-Ленинград: Изд-во АН СССР, 1954. 28 с.

8. Громова Л.В., Груздков А.А. Кинетические параметры гидролиза мальтозы и всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс в хронических опытах. В: Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2002, т. 88, nr 4, с. 510-518.

9. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Изд-во МГУ, «Наука», 2004. 525 с.

10. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты. Москва: Изд-во МГУ, 1992. 87 с.

11. Красильников Н.А. Лучистые грибки. Москва: Наука, 1970. 536 с.

12. Маланин Л.П., Морозов А.П., Селиванова А.С. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве. Москва: Агропромиздат, 1988. 319 с.

13. Постолакий О.М., Бурцева С.А. Влияние миллиметрового излучения на рост и липидообразование *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 и его вариантов. В: Электронная обработка материалов, 2009, nr 2, с. 93−97.

14. Ракова Т.Н. Применение микробных метаболитов в животноводстве. Кишинев: Штиинца, 1985. 80 с.

15. Зарайская И.Ю. Системный анализ оборонительного поведения крыс Вистар при обучении двустороннему избеганию. В: Журнал ВНД, 1995, т. 45, nr 3, с. 472-478.

16. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Егорова Н.С. Москва: Изд-во МГУ, 1995. 242 с.

17. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – Под редакцией М.О. Биргер. Москва: Медицина, 1982, с. 172-182.

18. Шептицкий В.А., **Березюк Ю.Н**., Бурцева С.А. Условно-рефлекторная деятельность белых крыс при длительном применении биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. În: Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii, 2017, nr 1 (331), p. 16-24.

19. **Bereziuk Y**. Antimicrobial characteristics of *Streptomyces fradiae* 19 isolated from chernozem soil of the central part of the Republic of Moldova. In: Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie, 2016, tom XXIII, is. 2, p. 56-61.

20. **Bereziuc Iu.** Influența extractului de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană din biomasa *Spirulina (Arthrospira) platensis* asupra creșterii și lipidogenezei tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. În: Studia Universitatis Moldaviae. Seria Ştiinţe reale şi ale naturii, 2017, nr 6(106), p. 30-34.

21. Boortseva S. et al. Qualitative and quantitative composition of lipids of biomass of streptomycetes after cultivation on media with different composition. In: Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie, 2015, Tom XXII, Issue: 2, p. 57-62.

22. Dey P., Harborne J. Metods in Plant Biochemistry. Carbohydrates. Press, 1993. V. 2, 529 p.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

2. Статьи в различных научных изданиях

2.2 в иностранных изданиях

1. Boortseva S., **Bereziuk Y**., Byrsa M., Chiselitsa O., Manciu A., Chiselitsa N. Qualitative and quantitative composition of lipids of biomass of streptomycetes after cultivation on media with different composition. In: Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie. 2015, Tom XXII, Issue: 2, p. 57-62. Print-ISSN: 1224-5119.

2. **Bereziuk Y**. Antimicrobial characteristics of *Streptomyces fradiae* 19 isolated from chernozem soil of the central part of the Republic of Moldova. In: Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie. 2016, Tom XXIII, Issue: 2, p. 56-61. Print-ISSN: 1224-5119.

3. **Bereziuk Y**., Boortseva S., Garaeva S., Byrsa M., Manciu A. The amino acid composition of the biomass of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-ac-11, cultivated on a complex medium with bio products of a cianobacterial nature. In: Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie. 2017, Tom XXIV, Issue: 2, p. 60-65. Print-ISSN: 1224-5119.

2.3 В изданиях из Национального Реестра профильных журналов с указанием категории. *Категория Б*

4. Шептицкий В.А., **Березюк Ю.Н**., Бурцева С.А. Условно-рефлекторная деятельность белых крыс при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. *Buletinul AŞM, Ştiinţele vieţii*. 2017, nr 1 (331), p. 16-24. ISNN 1857-064X.

5. **Bereziuc Iu**. Influența extractului de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană din biomasa *Spirulina (Arthrospira) platensis* asupra creșterii și lipidogenezei tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. *Studia Universitatis Moldaviae, Seria Ştiinţe reale şi ale naturii*. 2017, nr 6(106), p. 30-34. ISSN 1814-3237.

3. Статьи в научных сборниках

3.2. Сборники трудов интернациональных конференций

6. **Березюк Ю.Н**., Шептицкий В.А., Бурцева С.А., Братухина А.А., Бырса М.Н., Ганкевич А.Б. Влияние метаболитов стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы, на теплокровных животных. В: XI Международная научно-практическая конференция daRostim 2015 «Теория, практика и перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве». 2015, 17-19 июня, Сыктывкар, с. 25-26. ISBN 978-5-89606-541-8.

7. **Березюк Ю.Н.**, Братухина А.А., Бурцева С.А., Шептицкий В.А. Влияние препаратов из стрептомицетов почв Молдовы на привесы теплокровных животных в обычных и стрессорных условиях. In: XII International scientific-applied conference “Biotechnology for agriculture and environmental protection”. 2016, 7-10 september, Odessa, c. 37-38. ISBN 978-617-689-179-6.

8. **Березюк Ю**. Аминокислотный состав биомассы штамма *Streptomyces fradiae* 19 из черноземов Молдовы. В: Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології». 2016, 3-7 жовтня, Вінниця, с. 203-206. ISBN 978-966-924-354-6.

4. Материалы научных форумов

4.1. Интернациональные конференции (зарубежные)

9. **Березюк Ю.Н.** Рост и липидообразование стрептомицетов почв Молдовы на синтетических и комплексных средах. В: 19-ая Международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». 2015, 20 - 24 апреля, Пущино, с. 413-414. ISBN 978-5-9906586-0-8.

10. **Березюк Ю.** Влияние длительного применения биопрепарата на основе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на состав кишечной микрофлоры белых крыс. В: Всеукраинский медицинский журнал молодых ученых ХИСТ. 2017, вып. 19, Черновцы, с. 205.

4.2. Республиканские интернациональные конференции

11. **Bereziuk Y**. Influence of the medium of cultivation on antimicrobial characteristics of strain *Streptomyces fradiae*. In: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition. 2016, 12-13 october, Chisinau, p. 123. ISBN 978-9975-3129-3-6.

12. **Bereziuk Y**., Burtseva S., Kolotilova N., Byrsa M. Antagonism of *Streptomyces fradiae* in relation to phytopathogenic microorganisms. In: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition. 2016, 12-13 october, Chisinau, p. 122.

7. Патенты на изобретение, регистрационные сертификаты, материалы выставок

13. Brevet de invenție MD 1180 Y. Procedeu de stimulare a formării reflexelor condiţionate în perioada diminuării funcţiilor/ Şeptiţchi V., **Bereziuc Iu**., Burţeva S (MD). BOPI nr. 8/2017.

ADNOTARE

Bereziuc Iulia «Proprietăţile biosintetice ale *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 şi efectele fiziologice ale biomasei asupra organismului animalelor homeoterme (şobolani)». Teză de doctor în ştiinţe biologice, Chişinău, 2019.

Teza conţine 4 capitole, concluzii generale şi recomandări, bibliografie cu 211 titluri, 6 anexe, 119 pagini de text de bază, 31 de figuri, 12 tabele. Rezultatele obţinute sunt publicate în 13 lucrări ştiinţifice.

Cuvinte cheie: streptomicete, aminoacizi, lipide, carbohidraţi, activitate antimicrobiană, mediu nutritiv, efecte fiziologice, şobolani albi.

Domeniul de cercetare: 163.04 – Microbiologie.

Scopul lucrării constă în studiul proprietăţilor culturale şi activităţii biosintetice a tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 şi argumentarea posibilităţii utilizării ei ca producent de biomasă care influenţează parametrii fiziologici ai organismului animalelor homeoterme (şobolani albi) în condiţii normale şi de stres cronic.

Obiectivele lucrării: studiul proprietăţilor culturale ale tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11; determinarea capacităţilor de acumulare a biomasei şi sinteză a fracţiilor lipidice de bază; conţinutului de aminoacizi şi carbohidraţi la cultivarea tulpinii pe diverse medii nutritive; studiul influenţei substanţelor de origine cianobacteriană asupra acumulării biomasei *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 cu conţinut biochimic valoros; studiul influenţei biomasei tulpinii asupra proprietăţilor morfologice, funcţionale, indicii reproductivi şi microflora intestinală a animalelor homeoterme (şobolanilor albi) în condiţii normale şi de stres cronic.

Noutatea şi originalitatea ştiinţifică. Au fost obţinute date noi cu privire la conţinutul calitativ şi cantitativ al fracţiilor lipidice fiziologic active a tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Pentru prima dată s-a relevat efectul utilizării substanţelor de origine cianobacteriană în calitate de adaos adiţional la mediul nutritiv de bază. În premieră s-a stabilit că biomasa tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 contribuie la normalizarea microflorei intestinale şi procesului de asimilare a glucozei în intestinul subţire, duce la majorarea masei corporale şi facilitează formarea reflexelor condiţionate la animalele homeoterme (şobolanii albi).

Problema ştiinţifică soluţionată constă în elucidarea activităţii biosintetice a *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 – sursă de substanţe biologic active, ce a permis dirijarea proceselor pentru majorarea conţinutului de biomasă şi a fracţiilor lipidice stabilind perspectiva de utilizare a biomasei în scopul îmbunătăţirii indicilor morfologici, funcţionali şi reproductivi ai şobolanilor albi în condiţii de stres cronic.

Semnificaţia teoretică constă în argumentarea ştiinţifică a posibilităţii majorării cantităţii fracţiilor lipidice fiziologic active prin utilizarea substanţelor de origine cianobacteriană în calitate de stimulatori ai lipidogenezei la actinomicetele din genul *Streptomyces*. Deasemenea a fost studiată influenţa biomasei *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 asupra indicilor funcţionali şi reproductivi ai şobolanilor albi.

Valoarea aplicativă a lucrării. Se propune tulpina *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 cu activitate biosintetică înaltă; se propun noi variante de medii nutritive ce duc la majorarea productivităţii de biomasă a tulpinii. Rezultatele experimentale obţinute conturează perspectiva elaborării preparatelor biologic active în baza biomasei *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Implementarea rezultatelor. Rezultatele de bază a cercetărilor sunt implementate în procesul de studii a Universităţii de Stat din Tiraspol „T.G. Şevcenco” şi cercetările CNMN a IMB.

РЕЗЮМЕ

Березюк Юлия «Биосинтетические свойства *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и физиологические эффекты биомассы на организм теплокровных животных (крыс)». Диссертация кандидата биологических наук, Кишинев, 2019.

Диссертация содержит введение, 4 главы, выводы и рекомендации, библиографический список из 211 наименований, 6 приложений, 119 страниц основного текста, 31 рисунок, 12 таблиц. Опубликовано 13 научных работ.

Ключевые слова: стрептомицеты, аминокислоты, липиды, углеводы, антимикробная активность, питательная среда, физиологические эффекты, белые крысы.

Область исследования: 163.04 – Микробиология.

Цель работы: изучение культуральных свойств и биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и обоснование возможности применения его в качестве продуцента биомассы, влияющей на физиологические показатели организма теплокровных животных (белых крыс) в обычных физиологических условиях и при действии хронического стресса.

Задачи работы: изучение культуральных свойств штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11; определение способности к накоплению биомассы и синтезу основных липидных фракций, аминокислотного и углеводного состава при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на разных средах; исследование влияния веществ цианобактериального происхождения на способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 активно наращивать биомассу с измененным качественным составом; исследование влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на морфологические, функциональные, репродуктивные показатели, а также на количественные характеристики отдельных представителей микрофлоры кишечника теплокровных животных (белых крыс) в обычных условиях и при хроническом стрессе.

Научная новизна и оригинальность. Получены данные о качественном и количественном составе физиологически активных липидных фракций штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Впервые выявлен эффект применения веществ цианобактериального происхождения в качестве дополнительного компонента к основной питательной среде. Обнаружено, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 способствует нормализации количества отдельных представителей микрофлоры кишечника, процессу всасывания глюкозы в тонкой кишке, увеличению прироста массы тела, облегчению выработки условных рефлексов.

Решенная важная научная проблема состоит в определении биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 – продуцента БАВ, что позволяет управлять процессами увеличения количества биомассы и липидных фракций, определяя перспективу использования ее с целью улучшения функциональных и репродуктивных показателей белых крыс в условиях хронического стресса.

Теоретическое значение работы. Научно обоснована возможность увеличения количества физиологически активных липидных фракций при использовании веществ цианобактериального происхождения в качестве стимуляторов их синтеза у актиномицетов рода *Streptomyces*. Изучено влияние биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на функциональные и репродуктивные показатели белых крыс.

Практическое значение. Предложен штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, отличающийся высокой биосинтетической активностью; предложены новые варианты питательных сред, способствующие увеличению количества биомассы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11; полученные экспериментальные данные наметили перспективу для разработки препаратов на основе биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Внедрение результатов. Основные результаты исследований внедрены в учебный процесс ЕГФ ПГУ им. Т.Г. Шевченко, а также в исследования НКНМ ИМБ.

ANNOTATION

Bereziuc Yulia «The biosynthetic properties of *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 and the physiological effects of biomass on the organism of homoioterm animals (rats)». PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2019.

The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 211 references. It comprises 119 pages of main content, 31 figures, 12 tables and 6 annexes. The results were published in 13 scientific papers.

Key words: streptomycetes, amino acids, lipids, carbohydrates, antimicrobial activity, nutrient medium, physiological effects, white rats.

Field of study: 163.04 – Microbiology.

Research goal consists in research of the cultural properties and biosynthetic activity of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 and substantiation of the possibility of using it as a biomass producer, affecting the physiological parameters of the organism of homoioterm animals (white rats) under normal physiological conditions and under the action of chronic stress.

Objectives: the study of the cultural properties of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11; determination of the ability to accumulate biomass and synthesis of basic lipid fractions, amino acid and carbohydrate composition during the cultivation of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 on different media; study of the effect of substances of cyanobacterial origin on the ability of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 to actively increase biomass with altered qualitative composition; study of the biomass of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 on morphological, functional, reproductive indicators, as well as on the quantitative characteristics of individual representatives of the intestinal microflora, homoioterm animals (white rats) under normal conditions and under chronic stress.

Scientific novelty and originality. The data on the qualitative and quantitative composition of the physiologically active lipid fractions of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 were obtained. For the first time, the effect of using substances of cyanobacterial origin as an additional component to the main nutrient medium was revealed. The biomass of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 was found to help normalize the number of the intestinal microflora microorganisms, the process of glucose absorption in the small gut, increase body weight gain, facilitate the development of conditioned reflexes.

The main scientific problem solved in the study consists in the elucidation of the biosynthetic activity of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 – a producer of biologically active substances, which allows to manage the processes of increasing the amount of biomass and lipid fractions, determining the prospect of using it with the aim of improving the functional and reproductive parameters of white rats under chronic stress.

Theoretical value. The possibility of increasing the amount of physiologically active lipid fractions using substances of cyanobacterial origin as stimulants of their synthesis in actinomycetes of the genus *Streptomyces* has been scientifically substantiated. The effect of the biomass of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 on the functional and reproductive characteristics of white rats was studied.

Applicative value. The proposed strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, characterized by high biosynthetic activity; new nutrient media options have been proposed to increase the amount of *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 biomass; Experimental data have outlined the prospects for the development of drugs based on the biomass of the strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Implementation of scientific results. The main results of the research are implemented in the educational process of the Faculty of Natural Sciences of the Shevchenko USN, as well as in the work of the National Collection of Non-pathogenic Microorganisms IMB.

БЕРЕЗЮК ЮЛИЯ

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ac-11 И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ БИОМАССЫ НА ОРГАНИЗМ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ (КРЫС)

163.04 – МИКРОБИОЛОГИЯ

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Подписано к печати: 08.04.19 Формат бумаги 60x84 1/16
Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 50 экз.
Усл. печ. л: 2,0 авт. листов Заказ № 744

Изд-во Приднестр. ун-та. 3300, Тирасполь, ул. Мира, 18

MINISTERUL EDUCAŢIEI, CULTURII ŞI CERCETĂRII
AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 579.873.71+[574.36:599.323.4](043.3)

BEREZIUC IULIA

PROPRIETĂŢILE BIOSINTETICE ALE *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ac-11 ŞI EFECTELE FIZIOLOGICE ALE BIOMASEI ASUPRA ORGANISMULUI ANIMALELOR HOMEOTERME (ŞOBOLANI)

163.04 – MICROBIOLOGIE

Autoreferatul tezei de doctor în ştiinţe biologice

CHIŞINĂU, 2019