

**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

**Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Научный руководитель: **БУРЦЕВА Светлана,**
доктор хабилитат биологических наук,
профессор, специальность 167.01 –
Биотехнология, бионанотехнология

Научный консультант: **ШЕПТИЦКИЙ Владимир,**
доктор хабилитат биологических наук,
доцент, специальность 165.01 –
Физиология человека и животных

Автор: **БЕРЕЗЮК Юлия**

КИШИНЕВ, 2019

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL
REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 636.087.8:[579.873.71+599.323.4](043.3)

BEREZIUC IULIA

**PROPRIETĂȚILE BIOSINTETICE ALE *STREPTOMYCES
FRADIAE* CNMN-AC-11 ȘI EFECTELE FIZIOLOGICE ALE
BIOMASEI ASUPRA ORGANISMULUI ANIMALELOR
HOMEOTERME (ȘOBOLANI)**

163.04 – MICROBIOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:	BURȚEVA Svetlana, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, specialitatea 167.01 – Biotehnologie, bionanotehnologie
Consultant științific:	ȘEPTIȚCHII Vladimir, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător, specialitatea 165.01 – Fiziologia omului și animalelor
Autor:	BEREZIUC Iulia

CHIȘINĂU, 2019

© Bereziuc Iulia, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

РЕЗЮМЕ (на румынском, русском и английском языках).....	6
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	9
ВВЕДЕНИЕ.....	10
1. СТРЕПТОМИЦЕТЫ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИИ.....	17
1.1. Морфология и биохимический состав биомассы стрептомицетов при разных условиях роста.....	17
1.2. БАВ, синтезируемые стрептомицетами, и использование их в практике... ..	26
1.3. <i>Streptomyces fradiae</i> как перспективный продуцент БАВ.....	37
1.4. Выводы по главе 1.....	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	43
2.1. Объект исследования.....	43
2.2. Методы исследования.....	44
2.3. Выводы к главе 2.....	56
3. МОРФО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ <i>STREPTOMYCES FRADIAE</i> CNMN-Ас-11.....	58
3.1. Особенности штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11 (<i>Streptomyces sp.</i> 19) накапливать биомассу и липиды при росте на средах разного состава.	58
3.2. Определение таксономического положения штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11 (<i>Streptomyces sp.</i> 19)	63
3.3. Накопление биомассы, синтез липидов, углеводов и аминокислот штаммом <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	66
3.4. Антимикробная активность штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11....	70
3.5. Влияние метаболитов <i>Arthrospira platensis</i> на рост и липидный состав биомассы штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	74
3.6. Синтез аминокислот и углеводов штаммом <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN- Ас-11 при культивировании на среде R с препаратами BioR и СПС _{Zn}	81
3.7. Выводы по главе 3.....	84
4. ДЕЙСТВИЕ БИОМАССЫ ШТАММА <i>STREPTOMYCES FRADIAE</i> CNMN-Ас-11 НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОРГАНИЗМА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ (КРЫС).....	86
4.1. Токсикологические свойства биомассы и культуральной жидкости штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	87

4.2.	Изменение массы тела лабораторных животных под влиянием биомассы штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	89
4.3.	Действие биомассы штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11 на фертильность экспериментальных животных.....	92
4.4.	Всасывание пищевых веществ в тонкой кишке под влиянием биомассы штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	94
4.5.	Нейрофизиологические аспекты оборонительного поведения экспериментальных животных разных возрастных групп, получавших биомассу штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	99
4.6.	Влияние биомассы штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11 на отдельных представителей кишечной микрофлоры белых крыс	104
4.7.	Прирост массы тела лабораторных животных под влиянием биомассы штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11, полученной при культивировании на среде R с веществами из <i>Arthrospira platensis</i>	110
4.8.	Влияние биомассы штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11, полученной на среде R с препаратом BioR, на нейрофизиологические аспекты оборонительного поведения экспериментальных животных.....	113
4.9.	Выводы по главе 4.....	116
	ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ.....	118
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	135
	Приложение 1. Морфо-культуральные свойства штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	136
	Приложение 2. Акт о внедрении результатов № 9 от 07.12.2017.....	137
	Приложение 3. Справка о депонировании штамма <i>Streptomyces fradiae</i> CNMN-Ас-11.....	138
	Приложение 4. Акт о внедрении научных результатов №105, выданный НКНМ ИМБ, от 05.12.2017.....	139
	Приложение 5. Патент на изобретение.....	140
	Приложение 6. Диплом Международной Специализированной Выставки «INFOINVENT», 2017.....	141
	ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ.....	142
	CV АВТОРА.....	143

ADNOTARE

Bereziuc Iulia «Proprietățile biosintetice ale *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 și efectele fiziologice ale biomasei asupra organismului animalelor homeoterme (șobolani)». Teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2019.

Teza conține 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 211 titluri, 6 anexe, 119 pagini de text de bază, 31 de figuri, 12 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 13 lucrări științifice.

Cuvinte cheie: streptomicete, aminoacizi, lipide, carbohidrați, activitate antimicrobiană, mediu nutritiv, efecte fiziologice, șobolani albi.

Domeniul de cercetare: 163.04 – Microbiologie.

Scopul lucrării constă în studiul proprietăților culturale și activității biosintetice a tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 și argumentarea posibilității utilizării ei ca producător de biomasă care influențează parametrii fiziologici ai organismului animalelor homeoterme (șobolani albi) în condiții normale și de stres cronic.

Obiectivele lucrării: studiul proprietăților culturale ale tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11; determinarea capacităților de acumulare a biomasei și sinteză a fracțiilor lipidice de bază; conținutului de aminoacizi și carbohidrați la cultivarea tulpinii pe diverse medii nutritive; studiul influenței substanțelor de origine cianobacteriană asupra acumulării biomasei *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 cu conținut biochimic valoros; studiul influenței biomasei tulpinii asupra proprietăților morfologice, funcționale, indicii reproductivi și microflora intestinală a animalelor homeoterme (șobolanilor albi) în condiții normale și de stres cronic.

Noutatea și originalitatea științifică. Au fost obținute date noi cu privire la conținutul calitativ și cantitativ al fracțiilor lipidice fiziologic active a tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Pentru prima dată s-a relevat efectul utilizării substanțelor de origine cianobacteriană în calitate de adaos adițional la mediul nutritiv de bază. În premieră s-a stabilit că biomasa tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 contribuie la normalizarea microflorei intestinale și procesului de asimilare a glucozei în intestinul subțire, duce la majorarea masei corporale și facilitează formarea reflexelor condiționate la animalele homeoterme (șobolanii albi).

Problema științifică soluționată constă în elucidarea activității biosintetice a *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 – sursă de substanțe biologice active, ce a permis dirijarea proceselor pentru majorarea conținutului de biomasă, aminoacizi și a fracțiilor lipidice stabilind perspectiva de utilizare a biomasei în scopul îmbunătățirii indicilor morfologici, funcționali și reproductivi ai șobolanilor albi în condiții de stres cronic.

Semnificația teoretică constă în argumentarea științifică a posibilității majorării cantității fracțiilor lipidice fiziologic active prin utilizarea substanțelor de origine cianobacteriană în calitate de stimulatori ai lipidogenezei la actinomicetele din genul *Streptomyces*. De asemenea a fost studiată influența biomasei *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 asupra indicilor funcționali și reproductivi ai șobolanilor 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 productivității de biomasă a tulpinii. Rezultatele experimentale obținute conturează perspectiva elaborării preparatelor biologice active în baza biomasei *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Implementarea rezultatelor. Rezultatele de bază a cercetărilor sunt implementate în procesul de studii a Universității de Stat din Tiraspol „T.G. Șevcenco” și cercetările CNMN a IMB.

РЕЗЮМЕ

Березюк Юлия «Биосинтетические свойства *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-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-Ас-11; определение способности к накоплению биомассы и синтезу основных липидных фракций, аминокислотного и углеводного состава при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на разных средах; исследование влияния веществ цианобактериального происхождения на способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 активно накапливать биомассу с измененным качественным составом; исследование влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11. Впервые выявлен эффект применения веществ цианобактериального происхождения в качестве дополнительного компонента к основной питательной среде. Обнаружено, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11 – продуцента БАВ, что позволяет управлять процессами увеличения количества биомассы, аминокислот 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-Ас-11 на функциональные и репродуктивные показатели белых крыс.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧ	– агар Чапека с глюкозой
СР-I	– синтетическая среда Красильникова I
КГА	– картофельно-глюкозный агар
МПА	– мясо-пептонный агар
МПБ	– мясо-пептонный бульон
ОА	– овсяный агар
КАА	– крахмало-аммиачный агар
ПГ	– среда Придгема и Готтлиба (глюкозо-аммиачный агар)
ТСА	– триптон-соевый агар
АСБ	– абсолютно сухая биомасса
АК	– аминокислота
ЖК	– жирная кислота
БАВ	– биологически активные вещества
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
СПС_{Zn}	– сульфатированные полисахариды с цинком
ОМЧ	– общее микробное число
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИУК	– индолилуксусная кислота
КЖК	– короткоцепочечные жирные кислоты
БМ	– биомасса
КЖ	– культуральная жидкость
ФЛ	– фосфолипиды
СТ	– стерины
ТГ	– триглицериды

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и значимость исследования. Актиномицеты, в частности род *Streptomyces*, представляют большой интерес для ученых, работающих в области микробиологии, биохимии, генетики, биотехнологии и др. Микроорганизмы, принадлежащие к роду *Streptomyces*, известны своей нитевидной формой, большим геномом и сложным жизненным циклом развития, который включает образование устойчивых к высушиванию спор. Важно отметить, что род *Streptomyces* является самым крупным родом группы актиномицетов и включает более 500 видов, распространенных повсеместно, главным образом, в почве и водных экосистемах [44]. Способность колонизировать живые ткани и вызывать болезни растений и животных – достаточно редкое свойство среди стрептомицетов. Подавляющее большинство представителей рода *Streptomyces* являются сапрофитами, которые, обитая в почве, разрушают различные биополимеры и способствуют циркуляции питательных веществ в окружающей среде. В том числе есть множество исследований, указывающих на то, что штаммы стрептомицетов выделены из внутренней среды эукариотических организмов, где они ведут симбионтный образ жизни с помощью синтезируемых ими вторичных метаболитов [111, 164].

Из литературы известно, что стрептомицеты появились около 400 миллионов лет назад, когда земля была покрыта, в основном, зелеными растениями. Их основная роль состояла в растворении клеточной стенки или других поверхностных компонентов растений, грибов и насекомых. Предположительно, стрептомицеты сыграли определенную роль в компостировании растений и других компонентов и таким образом внесли свой вклад в формирование плодородного слоя почвы [119].

Стрептомицеты широко известны тем, что синтезируют множество вторичных метаболитов. Представители рода *Streptomyces* продуцируют примерно 2400 уникальных соединений различного состава [106], в частности, большинство антибиотиков, используемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве, являются продуктами метаболизма разных штаммов стрептомицетов. Кроме того, стрептомицеты являются продуцентами противоопухолевых, противовирусных и антипаразитарных соединений, ферментов, гормонов, витаминов, иммунодепрессантов, веществ с нейролептическим действием, биосурфактантов, гербицидов, стимуляторов роста растений и животных и других веществ, применяющихся в медицине, фармацевтическом производстве, ветеринарии, сельском хозяйстве и других отраслях [24, 119, 120, 134, 181].

Примечательно то, что штаммы рода *Streptomyces* обладают способностью к хорошему росту в лабораторных и промышленных ферментерах.

Применение продуктов микробиологического синтеза стрептомицетов в сельском хозяйстве является весьма перспективным. Их использование в виде комплексных препаратов, дополняющих основной рацион сельскохозяйственных животных, приводит к повышению продуктивности, оптимизации метаболизма и работы иммунной системы. Это представляет особый интерес, т.к. основной задачей сельского хозяйства, в том числе и животноводства, является повышение рентабельности. Этого можно достичь, если животные и птица здоровы и устойчивы к действию неблагоприятных факторов, что и обеспечивается полноценным кормлением и использованием кормовых добавок, которые обладают, помимо питательной ценности, антиоксидантными, антибактериальными, антистрессовыми, иммуномодулирующими, антипаразитарными свойствами, способствуют перевариванию корма и его всасыванию в пищеварительном тракте, стимулируют секрецию пищеварительных ферментов, ингибируют развитие патогенной микрофлоры в кишечнике, что положительно сказывается на общей резистентности и продуктивности животных [46, 47, 105, 149, 159]. Кроме того, внедрение интенсивных технологий, которые направлены на получение максимального количества продукции с наименьшими затратами, как правило, сопровождается появлением дополнительных стресс-факторов, действующих на сельскохозяйственных животных, что негативно отражается на их продуктивности. Особо следует подчеркнуть, что комплексные препараты, полученные на основе стрептомицетов, являются экологически безопасными, обладают физиологичностью, практически не вызывают побочных эффектов и осложнений, а также имеют достаточно низкую стоимость. Промышленное производство таких препаратов является весьма успешным. Значительное место занимают поиск, выделение, идентификация и селекция высоко активных штаммов для синтеза биологически активных веществ (БАВ) в большом количестве. Кроме того, для масштабного синтеза биологически активных соединений с целью повышения продуктивности синтезирующих штаммов необходимо рациональное использование различных компонентов питательных сред, в том числе важен поиск новых стимуляторов биосинтетической активности штаммов-продуцентов [169, 211].

Как следует из вышеизложенного, изучение культуральных и биохимических свойств, состава биомассы и поиск способов повышения ценных качеств штаммов-продуцентов стрептомицетов, использующихся в науке и промышленности (усовершенствование сред, поиск природных стимуляторов роста и биохимической

активности), дают возможность управления биосинтетической деятельностью микроорганизма.

Цель работы: изучение культуральных свойств и биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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 исследования:

1. Изучение культуральных свойств, однородности и стабильности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11 на разных средах;

3. Исследование влияния веществ цианобактериального происхождения на способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 активно накапливать биомассу и синтезировать аминокислоты, физиологически активные липидные фракции и углеводы;

4. Исследование влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11 на количественные характеристики отдельных представителей микрофлоры кишечника теплокровных животных (белых крыс) в обычных условиях и при действии стресс-факторов.

Научная новизна и оригинальность полученных результатов. Получены новые данные о качественном и количественном составе физиологически активных липидных фракций штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Впервые выявлен эффект применения веществ цианобактериального происхождения в качестве дополнительного компонента к основной питательной среде. Обнаружено, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-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-Ас-11 – продуцента БАВ, что позволяет управлять процессами увеличения количества биомассы, аминокислот и липидных фракций, определяя перспективу использования ее с целью улучшения функциональных и репродуктивных показателей белых крыс в условиях хронического стресса.

Теоретическое значение. 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-Ас-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.

Практическое значение. Предложен штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11 при глубинном культивировании штамма-продуцента; полученные экспериментальные данные наметили перспективу для разработки препаратов на основе биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 для повышения адаптивных возможностей организма теплокровных животных; основные результаты работы внедрены в учебный процесс естественно-географического факультета ПГУ им. Т.Г. Шевченко, а также в исследования, проводимые в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов ИМБ.

Апробация результатов 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).

Результаты научных исследований, представленные в диссертации, были удостоены Грамоты Оргкомитета IV Международного медико-фармацевтического конгресса студентов и молодых ученых «Инновации и перспективы современной медицины» BIMCO 2017 за оригинальное научное исследование (Черновцы, 2017).

Публикации. На основе материалов диссертации опубликовано 13 работ, из которых 5 в рецензируемых научных журналах (включая 2 без соавторов).

Объем и структура 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, библиографический список из 211 наименований и 6 приложений.

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

Основное содержание диссертации:

1. СТРЕПТОМИЦЕТЫ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИИ содержит детальный анализ научных публикаций и синтез накопленных знаний в исследуемой области. Особое внимание было уделено вопросам, касающимся морфологии, биохимического состава и биосинтетической активности актиномицетов рода *Streptomyces*. Проанализировано действие различных факторов, влияющих на биосинтетическую активность актиномицетов, в том числе и стрептомицетов. Рассмотрены физиологически активные вещества, синтезируемые актиномицетами рода *Streptomyces*, и их практическое значение.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ включает в себя обоснование и описание объекта исследования и экспериментальных методов. В качестве объекта исследования использовался штамм, хранящийся в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии как *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11. В ходе экспериментальной работы для определения биосинтетической активности использовались методы определения продуктивности биомассы стрептомицетов, ее количественного и качественного липидного состава, содержания в ней аминокислот и углеводов. Описание колоний штамма производили по методу, представленному в [41]. При определении антагонистической активности

метаболитов штамма применяли метод агаровых блочков. Работу с животными проводили, используя, в основном, методы наблюдения, оценки морфо-функциональных показателей их организма, а также методы стрессирования и выработки классических и инструментальных условных рефлексов. Все эксперименты были проведены в трехкратном повторе, представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением.

3. МОРФО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ас-11 отражает результаты скрининга штаммов, выделенных из почвы Центральной части Молдовы, по способности накапливать биомассу и липиды с выявлением наиболее активных продуцентов. Кроме того, глава содержит данные исследования морфо-культуральных особенностей и биосинтетических возможностей (образование биомассы, липидов, углеводов и аминокислот) штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, а также данные о его антимикробной активности. Также в главе продемонстрирована возможность применения веществ из *Arthrospira platensis* в качестве дополнительного компонента к основной питательной среде для исследования количественного выхода биомассы, изменения содержания липидов, углеводов и белков в биомассе *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

4. ДЕЙСТВИЕ БИОМАССЫ ШТАММА *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ас-11 НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОРГАНИЗМА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ (КРЫС) включает результаты научных исследований, направленных на изучение возможности использования биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 для повышения резистентности организма животных к действию стрессогенных факторов. В главе изложены результаты определения токсичности биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 и исследования влияния биомассы и культуральной жидкости изучаемого стрептомицета на морфологические, функциональные, репродуктивные показатели и поведенческие характеристики белых крыс, в том числе и на состав микрофлоры кишечника, в обычных физиологических условиях и условиях хронического стресса. Показана возможность коррекции стрессовых нарушений у теплокровных животных (крыс), а именно: повышение интенсивности роста, интенсификация процессов всасывания активно транспортируемых пищевых веществ в тонкой кишке, облегчение процесса обучения навыкам оборонительного поведения и уменьшение явлений дисбактериоза кишечника в условиях хронического воздействия стрессогенного фактора при скармливании животным биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces*

fradiae CNMN-As-11. Кроме того, изложены результаты исследования влияния биомассы *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11, выращенной на комплексной среде R с препаратом BioR, на определенные морфологические показатели и поведенческие характеристики белых крыс в обычных физиологических условиях и условиях хронического стресса.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ содержат в сжатой форме основные результаты, полученные в процессе проведенных исследований, даны практические рекомендации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ включает в себя 211 источников, цитируемых в диссертации.

ПРИЛОЖЕНИЯ содержат таблицу «Культуральные свойства *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11», копии справок о внедрении результатов, паспорта культуры, патента на изобретение и диплома, сопровождающего медаль, полученную на международной выставке инноваций.

1. СТРЕПТОМИЦЕТЫ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

1.1. Морфология и биохимический состав биомассы стрептомицетов при разных условиях роста

Актиномицеты и, в том числе, наиболее широко распространенный в природе род *Streptomyces* выделяются среди микроорганизмов способностью к образованию множества физиологически активных веществ: антибиотиков, витаминов, ферментов, липидов, аминокислот, фитогормонов и пр., стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных животных и растений. Данные вещества находят применение в различных сферах жизни: фармацевтической промышленности, медицине, сельском хозяйстве, в том числе растениеводстве и ветеринарии [21, 24, 119, 120, 134, 181].

Однако не все известные штаммы обладают способностью накапливать в биомассе достаточное количество продукта, который необходимо получить. В связи с этим одной из задач исследований является усиление природной способности микроорганизма продуцировать те или иные вещества путем применения различных питательных сред, а также ряда химических и физических агентов для регулирования биосинтеза интересующего продукта, оказывающего положительное действие на микроорганизм. Поэтому изучение штаммов-продуцентов, отбор из них наиболее продуктивных, разработка практических рекомендаций для поддержания синтезирующей активности штаммов являются достаточно важными моментами в изучении жизнедеятельности таких микроорганизмов, как актиномицеты.

Актиномицеты – организмы, которые имеют прокариотный тип клеточной организации и обладают способностью к формированию мицелия диаметром 0,4–1,5 мкм. Они являются грамположительными микроорганизмами, в их ДНК содержится высокое (60 – 75 мол %) относительное содержание ГЦ-пар оснований [118].

Мицелий актиномицетов формируется за счет гиф, которые могут достигать значительной длины. При росте актиномицетов на агаризованных питательных средах образующийся мицелий частично погружен в субстрат – это т.н. субстратный мицелий, при дальнейшем росте на отдельных ветках субстратного мицелия – спороносцах, образуется воздушный мицелий.

В гифе актиномицета выявляются все компоненты, свойственные бактериальной клетке: ядерная область, цитоплазма с различной степенью базофилии, вакуоли, волютиновые гранулы, клеточная стенка (Рисунок 1.1).

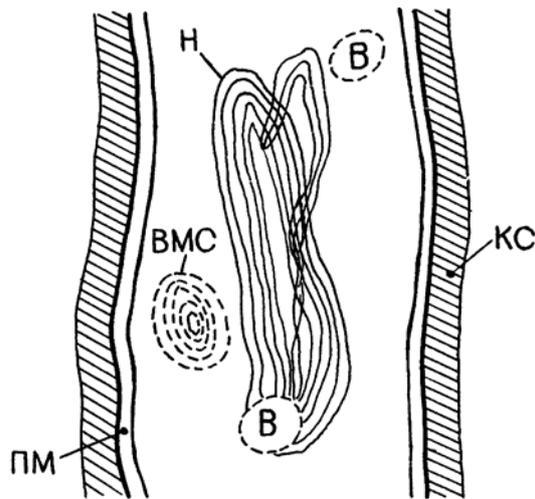


Рис. 1.1. Схема строения актиномицетной клетки:

Н – нуклеоид, ВМС – внутрицитоплазматические мембранные системы, ПМ – плазматическая мембрана, В – вакуоль, КС – клеточная стенка [45]

Актиномицеты – гетеротрофы (хемоорганотрофы), но, в зависимости от принадлежности к той или иной группе, выделяются представители с различными уровнями требовательности к источникам питания. Так, у термофильных актиномицетов выражена потребность в присутствии витаминов в питательной среде – биотина, фолиевой кислоты. Для большой группы актиномицетов, особенно для представителей рода *Streptomyces*, характерна олигокарбофилия. Большинство актиномицетов – аэробы. Они также устойчивы к высушиванию.

Большинство актиномицетов – организмы со сложным жизненным циклом, включающим стадии вегетативного роста и образования спор. В основном, представители актиномицетов имеют продолжительную мицелиальную стадию, они обычно образуют специальные репродуктивные структуры – споры, которые могут формироваться и на субстратном, и на воздушном мицелии. Жизненные циклы таких актиномицетов сходны на начальных этапах. Развитие начинается с прорастания споры, образующей 1-3 ростовые трубки, которые затем ветвятся, образуя мицелий. Мицелиальная стадия, как правило, хорошо выражена [45]. Цикл развития актиномицетов является одним из важных признаков, применяемых в систематизации данных организмов.

Актиномицеты широко распространены в почве, водной среде, как в пресных водоемах, так и в морях, а также в воздухе. Они обнаруживаются практически во всех видах почв, как правило, численно увеличиваясь в микробиоценозе по направлению с севера на юг, также в южных почвах возрастает и разнообразие различных представителей актиномицетов [44].

В частности, род *Streptomyces*, являющийся самым большим родом семейства (более 500 видов), отличается достаточно выраженной мицелиальной стадией в своем цикле развития. Воздушный мицелий часто развит достаточно сильно, на нем локализованы спорофоры – особые воздушные гифы, от которых отделяются конидии, благодаря которым происходит распространение вида. Многочисленные виды различают по строению спорофоров, форме колоний, их цвету, величине.

Размножаются стрептомицеты вегетативно и с помощью спор. Споры у стрептомицетов неподвижные, различной формы – шаровидные, овальные, палочковидные или цилиндрические. У одних культур оболочка спор гладкая, у других – волосистая, шиповидная, бугристая. Спороносцы, содержащие споры, могут быть прямые, волнистые, спиральные, мутовчатые. Спирали различаются по количеству, плотности витков [42, 45].

Стрептомицеты образуют тонкие, не разделенные на клеточные субъединицы, гифы диаметром 0,5–2,0 мкм, редко распадающиеся на фрагменты. Развиваясь, гифы образуют выраженный разветвлённый мицелий. Часть его проникает непосредственно в субстрат, а часть разрастается на поверхности, образуя заметные невооруженным глазом колонии диаметром 1–10 мм. Обычно колонии стрептомицетов небольшие, обособленные, лишайникоподобные, кожистые или маслянистые. Поверхность колоний первое время относительно гладкая, но со временем на ней формируется переплетение гиф воздушного мицелия, который может быть зернистым, порошковидным или бархатистым. В процессе роста и развития могут образовывать разнообразные пигменты, определяющие окраску субстратного и воздушного мицелия, также пигменты могут окрашивать среду культивирования [71].

Наиболее широко стрептомицеты представлены в почве, где могут составлять до 40,0% от общего количества почвенных бактерий [148]. В последние десятилетия обнаружено присутствие и широкое распространение стрептомицетов в океанических экосистемах, в том числе связанных с различными морскими организмами. Кроме земли и водного пространства имеет место все большее увеличение количества стрептомицетов в атмосфере. Множество штаммов стрептомицетов выделено из атмосферных осадков: дождевая вода, град, снег [103, 140, 190].

Стрептомицеты не устойчивы к кислотам и спиртам. В большинстве случаев для их оптимального роста необходима температура +25+35°C, среда с pH 6,5–8,0 [71].

Стрептомицеты – аэробные хемоорганотрофные микроорганизмы с метаболизмом окислительного типа, обладают широким набором ферментов, каталазоположительные,

как правило, восстанавливают нитраты до нитритов, разлагают аденин, казеин, желатин, гипоксантин, крахмал и L-тирозин. Многие стрептомицеты потребляют целлюлозу, хитин и другие труднорастворяемые природные вещества [32, 45].

Стрептомицеты отличаются высокой биосинтетической активностью. Они способны синтезировать вещества различной химической природы. В частности, почти две трети из всех натуральных веществ с антибактериальной активностью продуцируются стрептомицетами [171]. В связи с этим весьма важным представляется знание о химическом составе биомассы стрептомицетов.

Исследованием Cummins С. и Harris Н., 1958, показано, что в препарат фракций клеточной стенки штамма *Streptomyces aureofaciens* 8234, полученного при росте на питательной среде, содержащей 1,0% глюкозу ($t +30^{\circ}\text{C}$), входят следующие компоненты: галактоза, в меньшей степени глюкоза, мурамовая кислота, глюкозамин, в большом количестве глицин, глутаминовая кислота, аланин, а также диаминопимелиновая кислота – непотеиногенная аминокислота, является неотъемлемой частью пептидогликана стенки бактерий. Препараты штаммов *Streptomyces antibioticus* 8504 и *Streptomyces olivaceus* 8238 имеют схожий состав, кроме галактозы [128]. Японским ученым Tatsuro Y., 1965, получены схожие данные: фракции клеточной стенки штаммов *Streptomyces griseus* ATCC 10137, *Streptomyces viridochromogenes* IFO 3113, *Streptomyces hachijoensis* H-2609, *Streptomyces netropsis* NRRL 2268, *Streptomyces rubrirculi* 3631 включают большое количество L-диаминопимелиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глицина, аланина, следы сахаров (у *Streptomyces griseus* ATCC 10137 – глюкозы, галактозы, у *Streptomyces viridochromogenes* IFO 3113 – арабинозы, рибозы, маннозы). Также все препараты штаммов содержали глюкозамин и мурамовую кислоту. Штаммы были культивированы на среде следующего состава: декстроза – 10,0 г; глутамат натрия – 10,0 г; экстракт дрожжей – 3,0 г; K_2HPO_4 – 1,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02 г; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002 г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 г и дистиллированная вода – 1000 мл ($t=28^{\circ}\text{C}$) [202]. У штаммов *Streptomyces fradiae* (3535), *Streptomyces griseus* (3492), *Streptomyces lavendulae* (3416), *Streptomyces roseochromogenes* (3816), которые были культивированы на питательной среде (глюкоза – 10,0 г; глутамат натрия – 10,0 г; K_2HPO_4 – 0,5 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г; CaCl_2 – 0,025 г; ZnSO_4 – 0,025 г; FeSO_4 – 0,025 г и дистиллированная вода – 1000 мл) при $t=28^{\circ}\text{C}$ в течение 72 часов, был изучен карбогидратный состав препарата клеточной стенки. Показано, что препараты штаммов *Streptomyces fradiae* и *Streptomyces griseus* содержат около 22,0% и 21,6% восстановленных сахаров соответственно, причем карбогидратный состав у них был представлен только гексозами.

Препарат штамма *Streptomyces lavendulae* включает 13,2% сахаров, из них 1,5% представлены пентозами, максимальное количество сахаров выявлено в биомассе штамма *Streptomyces roseochromogenus* – 27,2%, из них пентоз – 1,2% [194].

В своем составе стрептомицеты содержат большое количество насыщенных жирных кислот, сложные полярные липиды – дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол [148]. Жирнокислотный состав биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-As-06 был изучен в работе Братухиной А.А., 2012. Было показано наличие насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с четным и нечетным числом углеродных атомов от C₁₄ до C₁₈, в частности, миристиновой (C_{14:0}), пентадекановой (C_{15:0}), пальмитоолеиновой (C_{16:1}), пальмитиновой (C_{16:0}), стеариновой (C_{18:0}), олеиновой (C_{18:1}) и линолевой кислот (C_{18:2}). Для этих исследований биомассу получили культивированием на комплексной среде М-1. Изучение аминокислотного состава этой же биомассы показало наличие в ней 18 аминокислот, из которых в наибольшем количестве представлены такие аминокислоты, как глутаминовая кислота, аланин, лейцин и глицин [23].

Известно, что состав и количество биомассы одного и того же штамма стрептомицетов могут отличаться в зависимости от условий культивирования: состав среды, рН, t°С среды, действие физических или химических факторов. В частности, Бурцевой С.А., 2002, были проведены исследования по изучению действия γ-излучения, УФ-лучей и комбинированного облучения на рост и липидообразование штамма *Streptomyces canosus* CNM-71 [24]. В результате была установлена возможность получения посредством воздействия на штамм этих физических факторов новых вариантов стрептомицетов, которые существенно отличались от исходного скоростью роста: количество биомассы у отдельных вариантов составляло 224,4% (*Streptomyces canosus* CNM-71 var. 6), 307,4% (*Streptomyces canosus* CNM-71 var. 2-IV-12) и 531,5% (*Streptomyces canosus* CNM-71 var. 2-IV-17) к исходной культуре. У липидов новых вариантов обнаружили повышенное содержание таких биологически важных фракций, как фосфолипиды (110,4–142,4%) и стерины (107,9–129,3% по отношению к контролю). У вариантов *Streptomyces canosus* CNM-71 var. 2-IV-17 и *Streptomyces canosus* CNM-71 var. 3-IV-12 количество стерина доходило до 174,7 и 201,0% по отношению к контрольной культуре соответственно. Жирнокислотный состав новых вариантов характеризовался преобладанием таких ненасыщенных жирных кислот, как C_{15:1} (пентадеценвая), C_{16:1} (пальмитолеиновая), C_{18:1} (олеиновая), а у некоторых вариантов – C_{18:2} (линолевая) и C_{18:3} (линоленовая) кислот.

В исследовании Постолакий О.М. с сотр., 2009, было проведено изучение влияния миллиметрового электромагнитного излучения на биосинтетические возможности (рост и липидообразование) штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 и двух его вариантов: *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-03 (полученный после γ -излучения) и *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-04 (полученный после комбинированного γ +УФ излучения). Время экспозиции составляло 0, 1, 3, 5, 10, 15 и 30 минут. Анализ изменения продуктивности биомассы у исследуемых штаммов показал, что у исходной культуры повышается продуктивность биомассы почти при всех экспозициях, достигая максимума (138,8%) при 5-минутном облучении. Определение количества липидов и их фракций в полученной биомассе показало, что под воздействием волн миллиметрового излучения происходит ингибирование их синтеза, исключение составляла фосфолипидная фракция: количество фосфолипидов увеличилось на 34,0% по сравнению с исходной культурой при экспозиции облучения в 1 мин. Дальнейшее увеличение времени экспозиции также вызвало ингибирование синтеза фосфолипидов [70].

Также, в исследовании Бурцевой С.А. с сотр., 2012, было применено воздействие электромагнитного излучения миллиметрового диапазона низкой интенсивности в течение 0 (контроль), 1, 3, 5, 10, 15 и 30 минут на *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 и *Streptomyces massaporeus* CNMN-Ас-06. В результате проведенных исследований было установлено: у штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ас-02 происходит увеличение выхода биомассы на 4,2–38,3% по отношению к контролю, также было отмечено влияние на увеличение накопления белка в биомассе при всех вариантах экспозиции. Максимум отмечался в вариантах, полученных при экспозиции 5 и 10 минут, где увеличение составило 139,3 и 131,5% по сравнению с контролем соответственно. У штамма *Streptomyces massaporeus* CNMN-Ас-06 наблюдалось, наоборот, снижение биосинтетической активности: количество биомассы уменьшилось на 5,6–27,9% по сравнению с контролем. Количество протеина биомассы также было снижено. Однако в отдельных вариантах опыта отмечали увеличение содержания в биомассе той или иной аминокислоты. Так, для штамма *Streptomyces massaporeus* CNMN-Ас-06 было отмечено увеличение содержания валина на 20,6% после применения излучения в течение 1 минуты, а после 15 минут – изолейцина – на 18,75%, а после 5 и 15 минут гамма-аминомасляной кислоты – на 42,1 и 52,6% соответственно [25].

В работе Liutskanova D.G. et al., 2005, было применено ультрафиолетовое облучение суспензии спор коммерческого штамма *Streptomyces fradiae* для увеличения количества образуемого им антибиотика тилозина. В результате были получены варианты,

выход тилозина у которых превышал продукцию исходного штамма-продуцента на 0,5–28,3%. [166]. В исследовании Khaliq S. et al., 2009, конечной целью которого также было увеличение выхода тилозина из биомассы *Streptomyces fradiae* NRRL-2702, применялось предварительное ультрафиолетовое и γ -облучение суспензии спор микроорганизма в течение разных временных промежутков. Были получены мутантные штаммы, далее произвели их культивирование. Так, у штамма *Streptomyces fradiae* NRRL-2702, подвергнутого ультрафиолетовому облучению с длиной волны, равной 300 нм, на расстоянии 6 см в течение 40 секунд, наблюдалось увеличение выхода тилозина в 2,7 раза после культивирования в течение недели по сравнению с выходом тилозина у исходного штамма [158].

Увеличения биосинтетической активности того или иного штамма можно добиться путем изменения состава питательной среды. Наличие определенных веществ в субстрате, используемом для культивирования штаммов, позволяет произвести направленный синтез необходимых соединений. Исследователи все чаще применяют растительное сырье в качестве одного из основных компонентов питательных сред. Широко используются комплексные или органические среды, в которых основной источник углерода – кукурузная, соевая мука и др. [80].

При исследовании биосинтетической активности 47 штаммов актиномицетов рода *Streptomyces*, выделенных из различных образцов почв центральной части Молдовы, для определения продуктивности биомассы и содержания в ней липидов штаммы культивировали на синтетических средах (ср. Чапека, Дюлоне) и комплексных (М-1 – основной источник углерода – кукурузная мука, среда R – кукурузная мука и крахмал). Проведенные исследования показали, что на комплексных средах сложного состава количество биомассы было в 2-3 раза больше, чем на «классических» синтетических средах, практически у всех изучаемых штаммов. Так, например, у шт. 19 количество биомассы составляло 13,9–14,1 г/л – на комплексных средах и 2,3–4,8 г/л – на синтетических средах. Состав среды в меньшей степени повлиял на содержание липидов в биомассе изучаемых штаммов. Так, наибольшее количество липидов в биомассе было обнаружено у шт. 47, культивируемого на средах сложного состава: 14,3–18,7%, а на синтетических средах: 7,3–8,4% [19].

Замена одного из основных компонентов питательной среды на более дешевый аналог может привести к изменению биосинтетической активности штаммов-продуцентов. Так, исходные штаммы *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* US101, AE52, 2435/M, являющиеся продуцентами ферментного комплекса, лизирующего

бактериальную стенку, выращивали на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 6,0; соевая мука дезодорированная – 8,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5,8; NaCl – 14,0; $CaCl_2$ – 4,5; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,04; вода дистиллированная – до 1 л, pH=7,8–8,2. При замене глюкозы на мелассу в количестве 30 г/л, соевой муки – на гороховую (8 г/л) либо на сухую сыворотку (8 г/л) проверяли изменение биосинтетической активности по выходу биомассы и литической активности культуральной жидкости в отношении тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*. Было обнаружено, что использование мелассы в составе питательной среды привело к увеличению выхода биомассы исследуемого штамма стрептомицета в 1,5–2 раза, причем стоимость среды уменьшилась в 1,3 раза. При этом повысилась в 2 и более раза литическая активность культуральной жидкости, полученной при культивировании штамма на новом варианте питательной среды с мелассой [85]. В исследовании Choi D. et al., 2007, при производстве тилозина штаммом *Streptomyces fradiae* TM-224 в питательную среду (K_2HPO_4 – 0,25 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5г; раствор микроэлементов – 3,0 мл; вода дистиллированная – до 1 л, pH=7,0–7,5; раствор микроэлементов (ppm): $FeCl_3$ – 500; $ZnCl_2$ – 600; $MnCl_2$ – 100; $CoCl_2$ – 300) добавляли сырую кукурузную муку в качестве источника энергии. В результате максимальная концентрация тилозина (6,2 г/л) наблюдалась при содержании кукурузной муки – 80 г/л, тогда как при содержании 50 г/л – 5,6 г/л, а при 110 г/л – 5,8 г/л [124].

Помимо этого, необходимо учитывать и концентрации веществ в питательной среде. Так, например, добавление пшеничных отрубей в количестве 3,34 г/л, порошка ламинарии (0,7 г/л) и поваренной соли (0,88 г/л) к основной питательной среде для культивирования морского стрептомицета, синтезирующего новый фермент фукоиданазу, который можно использовать в синтезе наночастиц золота, приводит к увеличению конечного продукта [169]. Оптимизация состава питательной среды изменением соотношения соевой муки, растворимого крахмала, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ для штамма *Streptomyces viridochromogenes*, синтезирующего авиламицин, позволила увеличить синтез вещества в 2,8 раза [211]. Авиламицин же является кормовым препаратом, увеличивающим среднесуточные привесы у свиней и птицы на завершающих этапах их производства. В исследовании Souagui Y. et al., 2015, установлено, что при применении питательной среды следующего состава: глюкоза – 3,476 г, дрожжевой экстракт – 3,876 г, NaCl – 41,140 г, дистиллированная вода – до 1,0 л, pH=10,0, наблюдалось увеличение синтеза вещества с выраженной антифунгальной активностью штаммом *Streptomyces sp.* SY-BS5, выделенным из почвы южных районов Алжира [195].

Важное значение для жизнедеятельности микроорганизмов имеют такие факторы, как температура и кислотность среды. Так, например, в опыте по оптимизации параметров выращивания продуцента кератиназы *Streptomyces ornatus* S 1220 установили увеличение выхода биомассы и ее кератиназной активности при добавлении к основной питательной среде карбоната кальция и при соблюдении температурного режима (+30°C) во время культивирования [68]. Показано, что для культивирования штамма *Streptomyces massaporeus* CNMN-Ас-06 на питательной среде СР-1 наиболее оптимальной является температура в +27°C. Количество биомассы, полученной при этих условиях, составило 14,3±0,7 г/л, тогда как повышение температуры до +35°C, а также понижение до +20°C, приводило к уменьшению выхода биомассы штамма (6,1±1,2 г/л и 5,5±0,8 г/л соответственно) [23]. В исследовании Souagui Y. et al., 2015, были получены данные о том, что максимальная продуктивность штамма *Streptomyces sp.* SY-BS5 в отношении синтеза вещества с противогрибковой активностью наблюдается при культивировании при температуре +30°C [195]. При культивировании штамма *Streptomyces fradiae* ТМ-224 для получения тилозина было установлено, что максимальное количество вещества образуется при температуре питательной среды +32°C (4,7 г/л) и при рН=7,5 (4,8 г/л) [124].

В настоящее время для получения биомассы микроорганизмов применяется метод ферментации на полутвердой среде. При применении этого метода микроорганизмы выращивают в жидкой питательной среде, абсорбированной на поверхности мелких частиц носителя. При этом типе ферментации в качестве носителя обычно используют пшеничные отруби, но также применяются молотая кукуруза, арахисовая мука и пр., в том числе и неорганические носители. Так, в исследовании Machado I. et al., 2013, применение нейлоновой губки для получения неомицина стрептомицетом *Streptomyces fradiae* привело к 55-кратному увеличению его выхода по сравнению с выходом продукта при глубинном культивировании. В ходе эксперимента количество неомицина на 10-е сутки составило 13,903 µg/мл, тогда как при глубинном культивировании – 250 µg/мл [168]. Исследователи из Индии Vastrad B.M. и Neelagund S.E., 2014, для получения неомицина, синтезируемого штаммом *Streptomyces fradiae* NCIM 2418, также применяли метод ферментации на полутвердой среде, где носителем был жмых, полученный при производстве кокосового масла. В ходе эксперимента исследователи подбирали оптимальный состав жидкой питательной среды (оптимальное содержание добавочных продуктов следующее: хлорид аммония – 2,0%, нитрат натрия – 1,5%, L-гистидин –

0,25%, нитрат аммония – 0,25%). В результате опыта было получено увеличение выхода неомицина в 2,7 раза по сравнению с контролем [205].

1.2. БАВ, синтезируемые стрептомицетами, и использование их в практике

Актиномицеты обладают способностью синтезировать разнообразные вещества, многие из которых имеют большое практическое значение, причем актинобактериями синтезируется около 45% веществ из 22500 биологически активных метаболитов, выделенных из микроорганизмов [132]. Особый интерес для промышленности и научного сообщества представляют актиномицеты рода *Streptomyces*, т.к. они являются основными продуцентами различных БАВ [5, 6, 21, 24, 119, 120, 131, 134, 150, 181].

К настоящему времени выделено и описано более 15000 антибиотиков [41]. Более чем 75% антибиотиков синтезируется актиномицетами, а среди них примерно 80% производят представители рода *Streptomyces* [204]. Стрептомицеты являются основными продуцентами антибиотиков, производимых фармацевтической промышленностью [106, 130, 151]. Эти лекарственные вещества применяются для профилактики и лечения различных микробных заболеваний людей, животных, а также растений. Например, известно, что штаммы *Streptomyces griseus* продуцируют около 40 антибиотиков, а штаммы *Streptomyces hygroscopicus* – около 200 [118].

Самым известным антибиотиком, который синтезируется стрептомицетами, является стрептомицин. Его выделяют штаммы *Streptomyces griseus*, а также *Streptomyces raneus*, *Streptomyces humidus*, *Streptomyces reticuli* и др. Стрептомицин является антибиотиком широкого спектра действия, активен в отношении микобактерий туберкулеза, а также большинства грамотрицательных и некоторых грамположительных микроорганизмов [41]. Кроме того, штаммы стрептомицетов применяются в производстве следующих антибиотиков: *Streptomyces erythraeus* продуцирует эритромицин, *Streptomyces clavuligerus* – цефалоспорин, *Streptomyces vensuella* – хлорамфеникол, *Streptomyces aureofaciens* – хлортетрациклин, *Streptomyces noursei* – нистатин, *Streptomyces lincolensis* – линкомицин и клиндамицин, *Streptomyces kanamyceticus* – канамицин, *Streptomyces roseosporus* – даптомицин и т.д. [148].

Известно, что актиномицеты обладают антимикробной активностью против грамположительных микроорганизмов. Многочисленные исследования метаболитов стрептомицетов различными методами показали, что имеются штаммы, способные подавлять рост *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и других бактерий. Так, из почв Северной Иордании были выделены штаммы стрептомицетов, 40% из них проявили

антагонистическую активность против грамположительных бактерий [186], а при изучении морских актиномицетов был получен новый штамм *Streptomyces* ВТ-408, синтезирующий вещество SBR-22, которое проявляет активность против лекарственно-устойчивого *Staphylococcus aureus* и других грамположительных бактерий [197]. Также из актинобактерии *Streptomyces platensis*, выделенной из морской воды залива Тояма (Япония), выделены антибиотические вещества нового структурного типа – лидикамицин, и соединения TPU-0037-A, TPU-0037-B, TPU-0037-C и TPU-0037-D, которые показали активность в отношении метициллинустойчивого штамма *Staphylococcus aureus* [142].

Многие исследователи указывают на выраженную активность некоторых метаболитов стрептомицетов против патогенных грибов, а также *Candida albicans*. Так, препарат коронамицин, также синтезируемый стрептомицетами, подавляет рост *Cryptococcus neoformans* и других патогенных грибов [139], а штаммы, выделенные из образцов вод озера Байкал, обладают антагонистической активностью в отношении *Candida albicans* [82].

Множество исследований указывают, что метаболиты стрептомицетов различных штаммов обладают антибактериальной активностью против широкого спектра возбудителей. В частности, изоляты почв Индии и Непала могут подавлять рост грамположительных – *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, грамотрицательных микоорганизмов – *Enterobacter aerogens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella typhi* and *Shigella spp.* Изоляты из почв Антарктики показали выраженную активность также против *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* [174, 193].

Не меньшее значение имеет способность БАВ *Streptomyces* подавлять рост фитопатогенных бактерий и грибов. Это было показано в исследованиях изолятов стрептомицетов из почвенных образцов тропических лесов Бразилии, а также почв Танзании. Метаболиты выделенных штаммов обнаружили антимикробную активность против широкого спектра возбудителей, в том числе и против фитопатогенных бактерий и грибов: *Xanthomonas oryzae*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vasicatoria* и др. [173, 187]. Почвенный стрептомицет, выделенный из южной каштановой почвы и идентифицированный как *Streptomyces netropsis* ИМВ Ас-5025, не оказал угнетающего действия на условно-патогенные микроорганизмы, но проявил активный антагонизм по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам – возбудителям заболеваний зерновых, бобовых и овощных культур, что делает возможным его применение в растениеводстве в качестве биологического средства защиты растений [13]. Из почвы

плантации бананов в Хайнане, Китай, был выделен штамм *Streptomyces sp.* СВ-75, который обнаружил противогрибковую активность широкого спектра действия против 11 фитопатогенных грибов. Эксперименты показали, что заболеваемость грибковыми заболеваниями саженцев бананов снижалась после использования *Streptomyces sp.* СВ-75. Количество заболевших растений при этом составляло 10,23%, а среди контрольных растений – 83,12% [122]. Таким образом, стрептомицеты представляют собой привлекательную альтернативу химическим удобрениям, пестицидам и добавкам, что может привести к значительному увеличению роста сельскохозяйственных растений и борьбе с вредителями и болезнями. Во всем мире ведется множество исследований для разработки правильных составов, содержащих стрептомицетовые модификаторы в качестве их активных ингредиентов. Тем не менее в настоящее время продается очень мало продуктов на их основе. В частности, Mycostop (Verdera Oy, Финляндия) является единственным продуктом защиты растений на основе *Streptomyces*, зарегистрированным в ЕС; он также зарегистрирован в Канаде и США. Actofit и Astur, являющиеся продуктами метаболизма *Streptomyces avermitilis*, зарегистрированы как инсектициды на Украине [155].

Примечательна способность штамма *Streptomyces avermitilis* синтезировать вещества, являющиеся весьма эффективным средством борьбы с различными паразитами растений, человека и животных. Они объединены в общую группу под названием «авермектины». Штамм *Streptomyces avermitilis* синтезирует комплекс, состоящий из 8 авермектинов – 4 представителя группы А и остальные – группы Б. Авермектины группы А обладают противоопухолевым действием, а группы Б имеют выраженные инсектицидные, нематодоцидные и аскарицидные свойства. Антипаразитарные препараты, созданные на основе авермектинов, не оказывают негативное действие на организм человека и животных. Они действуют на нервную систему паразита, парализуя его. Препараты авермектинов весьма широко используются в растениеводстве и ветеринарии [40]. В последние годы сотрудниками Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины (г. Киев) на основе штамма *Streptomyces avermitilis* разработаны биопрепараты Аверком (производитель *Streptomyces avermitilis* ИМВ-Ас-5015) и Аверком Нова (Аверком+хитозан). Они проявляют высокую активность против фитопатогенных бактерий, грибов и нематод. Эти препараты применяются в растениеводстве, причем отмечено отсутствие влияния этих веществ на условно-патогенную и патогенную флору человека, что исключает появление лекарственной устойчивости при их применении [48]. Также исследователями Siddique S. et al., 2013,

было сообщено, что авермектин В1b, компонент коммерчески доступного препарата абамектина, являющегося продуктом, полученным на основе *Streptomyces avermitilis*, часто использовался в качестве инсектицидного агента [192].

В Китае, провинция Юньнань, из содержимого кишечника слона, *Elephas maximus*, был выделен штамм *Streptomyces sp.* SMU03. Из культуральной жидкости этого штамма было выделено вещество бутанолид. Это соединение в опытах *in vivo* и *in vitro* показало наличие противовирусного эффекта против нескольких подтипов вируса гриппа А (H1N1 и H3N2). Предположительный механизм действия – блокада НА₂-субъединицы гликопротеина вирусной мембраны [164].

Многочисленными исследованиями было показано положительное влияние препаратов стрептомицетов на росто-весовые показатели сельскохозяйственных животных. Так, липидные препараты, полученные из культур стрептомицетов и введенные в рационы откармливаемых свиней, повысили продуктивность на 10,0-15,0%, при этом они проявили достаточно высокий анаболический эффект (до 33,0%), что соизмеримо с действием стероидного анаболика – нероболила [26]. Применение кормогризина, который является высушенной мицелиальной массой *Streptomyces griseus* и содержит антибиотик гризин и остатки питательной среды и наполнитель (отруби, гидролизные дрожжи, кукурузная мука), показало увеличение привесов при выращивании цыплят, утят, поросят и телят [83]. Препарат биовит, который является высушенной мицелиальной массой *Streptomyces aureofaciens*, при использовании в качестве профилактического средства вместе с основным рационом способствует ускорению роста молодняка, повышает устойчивость к желудочно-кишечным заболеваниям, ведет к увеличению привесов и повышению продуктивности сельскохозяйственных животных [72]. В исследовании применение высушенной биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 показало увеличение массы тела опытных цыплят к 25 дню применения на 10,4 и 3,0% соответственно по отношению к контролю [7].

Исследователи Das S. et al., 2010, изучали влияние биомассы морских штаммов *Streptomyces sp.* CLS-28, *Streptomyces sp.* CLS-39 и *Streptomyces sp.* CLS-45 путем добавления ее в корм креветкам *Penaeus monodon* в количестве 1,0% от общей массы корма. Было показано, что в конце эксперимента масса и длина опытных групп креветок была значительно больше по сравнению с массой и длиной контрольной группы. Также в опытных группах возросла выживаемость ракообразных. Наиболее выраженный эффект отметили в опытной группе креветок, потреблявших вместе с кормом биомассу штамма

Streptomyces sp. CLS-28. Данные явления связывают с тем, что штаммы *Streptomyces sp.* обладают способностью к синтезу гидролитических ферментов, что привело к улучшению амилолитической и протеолитической активности в пищеварительном тракте креветок, и полученный корм был усвоен в большей степени [129]. Также было исследовано влияние корма с добавлением клеточной массы 7-ми штаммов *Streptomyces sp.*, выделенных из морских губок *Callyspongia diffusa*, *Mycale mytilorum*, *Tedania anhelans* и *Dysidea fragilis*, на показатели роста декоративной рыбы *Xiphophorus helleri*. Опытные группы получали данный вид корма в течение 50-и дней, после проведения замеров было показано, что все корма, дополненные биомассой штаммов *Streptomyces spp.*, улучшают показатели роста на 77,0–108,0% по сравнению с контролем. В данном исследовании столь выраженный эффект связывается с синтезом штаммами *Streptomyces spp.* индолилуксусной кислоты (ИУК) [135].

Большое значение имеет синтез стрептомицетами веществ, которые останавливают рост опухолевых клеток. Широко известны такие противоопухолевые средства, как даунорубицин (применяется с начала 1960-х гг.), доксорубицин, блеомицин. Все эти препараты используются при химиотерапии различных видов онкопатологии. Также постоянно идет поиск новых веществ с противоопухолевым действием. В 90-е годы XX века из *Streptomyces parvulus* было выделено вещество, названное манумицин А, обладающее противоопухолевой и антибиотической активностями [147]. Данное вещество действует как ферментный ингибитор, замедляющий процессы метаболизма в линиях клеточных опухолей, запуская в них процессы апоптоза. Изучение возможностей данного препарата, а также его механизма действия, легло в основу многих исследований [123, 160]. При изучении стрептомицетов из вод Атлантического океана, омывающих архипелаг Мадейра, в исследовании [178] было отобрано около 400 штаммов. У 22-х из изученных штаммов была обнаружена цитотоксическая активность против линии клеток рака толстой кишки человека. Также различными исследованиями обнаружилась антитуморозная активность против различных линий клеток опухолей у штаммов стрептомицетов, выделенных из почв, вод, растений Китая, Малайзии, Египта и других стран [179, 183, 200]. Два новых цитотоксических хинона – мармицины А и В – были получены из морского стрептомицета, который выделили из донных осадков в море Кортеса (Мексика). Было установлено, что мармицин А показывает в 18 раз большую противоопухолевую активность, чем его хлорированное производное, в отношении человеческих опухолевых клеток (НСТ-116) [170].

Стрептомицеты могут синтезировать в окружающую среду различные ферменты, участвующие в лизисе протеинов, кератина, полисахаридов. Так, штамм *Streptomyces griseoflavus* PTCC1130 синтезирует щелочную протеазу, которая используется в индустрии моющих средств, при продукции кожаных и текстильных изделий и пр. [152]. Также в 1990-е годы из горных районов Армении был выделен штамм *Streptomyces ornatus* S 1220, обладающий кератиназной активностью, в 6 раз более выраженной, чем у штамма *Streptomyces fradiospiralis* ВКМ А-157, также синтезирующего кератинрасщепляющие протеазы [91]. Кроме того, один из штаммов *Streptomyces massaporeus* образует α -L-арабинофуранозидазу, способную расщеплять некрахмальные полисахариды, содержащиеся почти во всех комбикормах для птицы. Важным является то, что применение этого ферментного препарата способствует повышению продуктивности кур, улучшению качества продукции [156]. В исследовании [59] была получена рекомбинантная ксиланаза штамма *Streptomyces coelicolor* Ac-738, действующая при нейтральном рН и отличающаяся умеренной термостабильностью. Изучалось действие данного фермента на ксилан растительного сырья, которое используется для получения кормов, применяющихся в животноводстве. Было показано увеличение количества сахаров, что приводит к увеличению питательности данного продукта. Сейчас ксиланазы широко применяются в производстве, ориентированном на переработку растительного сырья. Также в настоящее время ксиланазы используются в пищевой промышленности при производстве вин, пива, спирта, хлеба, соков для повышения выхода и качества продукции.

Из литературных данных известно также о синтезе стрептомицетами такого фермента, как фитаза. Ген фитазы выделен из генома *Streptomyces coelicolor* [113], исследование регуляторных механизмов для данного гена играет важную роль в разработке методов получения данного соединения микробного происхождения. Значение этого фермента трудно переоценить. Он участвует в расщеплении фитатов – комбинированных солей фитиновой кислоты, которые содержат большое количество фосфора. Фитатами богата зеленая часть растений, злаковые культуры, но они практически не усваиваются такими сельскохозяйственными животными, как свиньи и птицы. Применение фитазы позволяет снизить стоимость кормов и выделение фосфора в окружающую среду из организма птицы, помимо этого, повышается доступность белка и энергии кормов [79]. В почве Южной Африки обнаружен штамм стрептомицетов, получивший название *Streptomyces swartbergensis* sp. nov. Этот штамм характеризуется синтезом фермента тирозиназы [162].

Среди микроорганизмов-продуцентов род *Streptomyces* привлекает к себе внимание как один из источников получения аминокислот [151, 175]. Так, в результате микробного синтеза получают L-формы аминокислот, производство которых относительно экологически безопасно. Также путем направленного микробного синтеза можно получить соединения для ферментного способа производства аминокислот. Полученные аминокислоты широко используют в пищевой промышленности для продукции пищевых добавок (глутаминовая кислота), в сельском хозяйстве для подкормки животных с целью коррекции неполноценности растительных белков. В частности, в животноводстве можно применять т.н. кормовые добавки в виде микробной биомассы. Данные биодобавки содержат L-формы аминокислот, в частности набор незаменимых аминокислот [57]. Так, сумма незаменимых аминокислот в различных штаммах стрептомицетов составляет от 40,5 до 53,6% протеина биомассы [30]. Кроме того, было показано, что в биомассе штамма *Streptomyces massaporeus* 36, выделенного из почв Молдовы, содержится около 44,0% белка, а также достаточно большое количество незаменимых аминокислот [12]. Более ранними исследованиями установлено, что в мицелии штаммов стрептомицетов содержится 14-16, до 18 аминокислот, состав которых практически у всех одинаков, но имеют место изменения в количестве отдельных кислот. В основном, активные штаммы стрептомицетов накапливают лейцин, аланин, аспарагиновую и глутаминовую аминокислоты [25].

В производстве ингибиторов глюкозидаз используются штаммы *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* Ас-1734 из коллекции ФГБНУ ВНИИПД. На их основе были получены пищевые добавки, получившие название Люцентин и Виолацентин, содержащие также цитрат калия и мальтодекстрин. Применение данных добавок в хлебобулочном производстве позволяет получить изделия с более низким гликемическим индексом, которые спокойно могут применяться в питании больных сахарным диабетом, т.к. было показано, что употребление в рационе ингибитора глюкозидаз совместно с крахмалом приводит к понижению уровня глюкозы крови у подопытных животных на 40,0–60,0% [92]. В литературе имеются данные о препарате платензимицине, выделенном из штамма *Streptomyces platensis* МА7339 из почв Мальорки, Испания. Первоначально исследовали наличие антибактериальных свойств этого вещества. Платензимицин проявил антагонистическую активность против многих лекарственно-устойчивых грамположительных микроорганизмов: макролид- и ванкомицин-устойчивых штаммов *Enterococci spp.*, макролид-, линезолид-, ванкомицин- и метициллин-устойчивого *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. При

дальнейшем исследовании было обнаружено, что платензимидин является мощным ингибитором синтазы жирных кислот у млекопитающих и селективно ингибирует *de novo* липогенез и окисление жирных кислот, не влияя на биосинтез стерола в гепатоцитах. Кроме того, платензимидин приводит к увеличению чувствительности тканей к инсулину у мышей, снижая тем самым уровень глюкозы. Эти предварительные результаты могут использоваться в разработке производства новых средств для лечения метаболических заболеваний (сахарный диабет, стеатоз печени) [185].

Липиды являются важнейшими метаболитами, которые синтезируют стрептомицеты [3, 24, 64]. К липидам относятся свободные жирные кислоты, нейтральные глицериды, воски, фосфолипиды, сфинголипиды, в том числе гликосфинголипиды, оксипирины, стеринны и т.д. Липиды выполняют множество функций: являются основными структурными компонентами клеточных мембран, обеспечивая их пластичность, проявляют антибактериальные, антиоксидантные, иммуностимулирующие и противоопухолевые свойства, фосфолипиды регулируют активность мембранных ферментов [14, 56].

Стрептомицеты синтезируют и накапливают в своих клетках достаточно большое количество липидов. Содержание липидов в мицелии стрептомицетов составляет от 5,0 до 40,0% и более в зависимости от состава питательной среды и индивидуальных особенностей организма [24]. Фосфолипиды стрептомицетов обладают свойством стабилизировать систему антиоксидантной защиты организма, стеринная фракция в комплексе с полисахаридами и фосфолипидами проявляет иммуностимулирующее действие, а триглицериды являются энергетическим субстратом. Кроме того, фосфолипиды стрептомицетов характеризуются высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, которые, в свою очередь, играют важную роль как для самих микроорганизмов, так и при применении их биомассы в различных областях [24, 51].

При исследовании почвенных образцов из Южной Африки был выделен штамм стрептомицетов. Генетический анализ показал, что штамм тесно связан с *Streptomyces caelestis* NRRL 2418T (99,72%) и *Streptomyces azureus* NBRC 12744T (99,51%). В качестве типового штамма нового вида предлагается штамм HMC13T (=LMG 28849T =NRRL B-65294T), название которого *Streptomyces swartbergensis* sp. nov. Жирнокислотный анализ биомассы этого штамма показал наличие преимущественно разветвленных насыщенных жирных кислот: изопентадекановая кислота (i-15:0) – 14,4%, антеизопентадекановая (a-15:0) – 21,1%, изопальмитиновая (i-16:0) – 16,8%, пальмитиновая (16:0) – 6,2%, изомаргариновая (i-17:0) – 5,9% и антеизомаргариновая (a-C17:0) – 9,6% [162].

Исследования последних десятилетий направлены на поиск штаммов стрептомицетов, обладающих способностью синтезировать вещества, ингибирующие процессы перекисного окисления в клетках различных тканей и органов. Это важно, т.к. окислительный стресс является одним из патогенетических факторов развития хронических заболеваний человека, в том числе и нейродегенеративных [180]. Увеличение количества свободных радикалов на фоне снижения механизмов антиоксидантной защиты вызывает повреждение макромолекул клеток и тканей: белковых, липидных, ДНК. Были получены экстракты, выделенные из штаммов *Streptomyces spp.* MUSC 149^T и MUSC 164^T из почв мангровых лесов Малайзии. В максимальной концентрации они уменьшили количество радикального вещества DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) на 36,5% и на 18,1% соответственно [191]. Причем действие экстракта из штамма *Streptomyces sp.* MUSC 149^T связывают с наличием в нем органического соединения из группы пирролизидинов, обладающих выраженным антиоксидантным и противоопухолевым действием. Также из почвы мангровых лесов Малайзии исследователями Tan L.T. et al., 2017, был выделен штамм *Streptomyces sp.* MUM212, экстракт из биомассы которого был способен нейтрализовать такие свободные радикалы, как супероксидный анион, ДППГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и АБТС (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота), а также ионы хелатных металлов. Кроме того, данный продукт ингибировал перекисное окисление липидов (ПОЛ) [201]. Из почв Египта был выделен меланин-образующий штамм стрептомицетов, который определили как *Streptomyces glaucescens* NEAE-HB. Учитывая, что меланин может быть либо донором, либо акцептором электронов, проверили его возможности как антиоксиданта. Полученный пигмент уменьшил количество радикального вещества АБТС⁺ (2, 2'-азино-бис) на 57,2%. Кроме того, синтезированный таким образом меланин может использоваться в косметической промышленности [137]. Из культуральной жидкости штамма *Streptomyces sp.* UT1123 были выделены вещества понтемазин А и В. Эти вещества при исследовании оказали протективный эффект на нейроны гиппокампа мышей, которые подвергались глутамат-индуцированному повреждению [117]. Американскими исследователями при изучении биосинтетической способности штамма *Streptomyces sp.* RM-5-8 были выделены вещества – терфестатины В и С, оказавшие нейропротективный эффект при действии повреждающих факторов на первичную клеточную культуру гиппокампа крысы [206].

В ряде исследований на модельных животных выявлены нейропротекторные свойства метаболитов штаммов таких видов, как *Streptomyces purpeofuscus*, *Streptomyces nitrosporeus*, *Streptomyces griseoflavus*, *Streptomyces exfoliates* и некоторых других, их

способность предотвращать нейродегенерацию, спровоцированную окислительным стрессом [161, 163]. Из различных штаммов стрептомицетов выделены ингибиторы ПОЛ мембран клеток такие, как эстивофоенины А и В, бензастатины Н и I, месценгрицин, каркуиностагин В, и показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной перекисидации [161, 163]. Более того, некоторые из метаболитов стрептомицетов (лактацистин, ангидроэксфолиамицин, инубозины А, В и С и др.), оказывающие нейропротекторное действие при применении различных моделей нейродегенерации, обладают способностью стимулировать нейрогенез, оказывая влияние на ультраструктурную организацию различных нейрональных образований головного мозга [198], и дифференцировку нейральных стволовых клеток [104].

Из культуры *Streptomyces sp.* RK85-270 были выделены 2 циклических октапептида, названные октаминацинами А и В. Эти соединения подавляли индуцированную сосудистым эндотелиальным фактором роста пролиферацию и образование сосудов, что указывает на их антиангиогенное действие [153]. Штамм *Streptomyces sp.* DPUA1559, выделенный из лишайников в районе реки Амазонка, Бразилия, обнаружил способность к синтезу биосурфактанта, который может быть получен путем биотехнологического синтеза в большом количестве и в последующем применен в производстве и медицине [189].

Кроме того, имеются данные о синтезе стрептомицетами таких веществ, как фитогормоны. Фитогормонами называются субстанции, которые синтезируются в растениях, транспортируются по ним и в ничтожно малых дозах вызывают ростовые или формативные эффекты. К фитогормонам относятся ауксины, которые обладают способностью индуцировать деление и дифференцировку клеток, цитокинины, также способные стимулировать деление клеток, гиббереллины, стимулирующие ростовые процессы за счет растяжения клеток, этилен – единственный газообразный фитогормон, индуцирующий созревание плодов, а также абсцизовая кислота, обладающая выраженным ингибиторным эффектом на процессы метаболизма, обуславливая тем самым состояние покоя семян, почек и клубней [93]. В последние годы открыты новые вещества с фитогормональной активностью: брассиностероиды, жасминовая и салициловая кислоты, олигосахариды.

Одним из наиболее широко распространенных в природе и наиболее активным ауксином является ИУК. К ее образованию способны многочисленные микроорганизмы, в том числе и актиномицеты. Так, в исследовании [61] из 14 штаммов, изолированных из корневых тканей озимой ржи сорта Вятка 2 и определенных как актиномицеты, 10

синтезировали ИУК в достаточно большом количестве, причем было отмечено увеличение выхода метаболита вдвое при культивировании штаммов на вибрационном столе, когда обеспечивается максимальная аэрация культуры. Кроме того, было исследовано добавление в питательную среду аминокислоты триптофана, как предшественника ИУК, и отмечено увеличение выхода метаболита в 5,8 раз при добавлении ее в количестве 200 $\mu\text{g}/\text{мл}$ [61]. При исследовании штаммов стрептомицетов, полученных путем выделения из бурой лесной почвы восточного побережья Эгейского моря, была показана способность синтезировать ИУК в количестве от 10 до 15 $\mu\text{g}/\text{мл}$ на среде с добавлением триптофана у 60% из 30 изолятов, причем эта способность проявилась у штаммов, отнесенных к *Streptomyces globisporus*, *Streptomyces felleus*, *Streptomyces wedmorensis* [77].

Различные виды *Streptomyces* выделяют в окружающую среду вещества с инсектицидными свойствами. Например, штаммы *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*, *Streptomyces thermoarchaensis* и *Streptomyces bingchengensis* продуцируют милбемицины – макролидные антибиотики, для которых характерны инсектицидные и антигельминтные свойства [127, p. 25-52]. В частности, препарат милбемектин обладает выраженным антиакарицидным действием и широко используется в сельском хозяйстве против клещей с 1990 года [177]. В работе Samri S.E., 2017, была исследована инсектицидная активность против средиземноморской фруктовой мухи, *Ceratitis capitata*, 12-ти предварительно выбранных штаммов актинобактерий, выделенных из различных мест обитания в Марокко. Было показано, что штамм *Streptomyces* LD-37, сходный на 99,4% со *Streptomyces phaeochromogenes*, вызвал максимальную личиночную смертность – 98,0%. Кроме того, данный штамм привел к гибели 28,2% взрослых особей фруктовой мухи [188].

Литературные данные показывают, что практически все стрептомицеты могут продуцировать витамины группы В. Так, например, *Streptomyces olivaceus* образует антианемический витамин В₁₂. Культуры штаммов *Streptomyces griseus* 15, *Streptomyces aureovercillatus* 1306 и *Streptomyces aurigineus* 2377 в ходе культивирования на тех или иных средах продуцируют тиамин, рибофлавин, пиродоксин, биотин, никотиновую кислоту и витамин В₁₂ [51, 54]. Большое количество видов *Streptomyces* красно-розовой или желтой окраски выделяют пигментные вещества, которые являются предшественниками витаминов – каротины и каротиноиды. Синтез каротиноидов описан у штаммов *Streptomyces griseus*, *Streptomyces setonii* и *Streptomyces coelicolor*. В работе [135] исследовали каротиноид-синтезирующую способность штамма *Streptomyces*

AQVMM35, выделенного из морской губки *Mycale mytilorum* на юго-западном побережье Индии. В ходе исследования пришли к выводу, что данный стрептомицет синтезирует каротиноиды аналогично наземным стрептомицетам *Streptomyces griseus* и *Streptomyces coelicolor*, предложив исследуемый штамм в качестве альтернативы для производства данных пигментов в промышленных масштабах.

1.3. *Streptomyces fradiae* как перспективный продуцент БАВ

Культура *Streptomyces fradiae* была выделена Waksman и Henrici в 1916 году, относится к международному видовому эталону *Streptomyces fradiae* ISP 5063. Данный вид широко распространен в почвах, обнаруживаясь и в тропиках, и на севере [27, 54]. Обладает способностью к синтезу разнообразных физиологически активных веществ. Этот штамм при росте на натуральных средах неопределенного состава или синтетических средах имеет желтовато-коричневый цвет, растворимого пигмента не образует. При развитии на синтетических средах вначале образуется белый воздушный мицелий, который затем окрашивается в светлый красновато-коричневый цвет.

В 1949 г. З. Ваксман и Х. Лешевалье из культуры *Streptomyces fradiae*, изолированной из почвенного образца, выделили антибиотик. Было установлено, что он состоит из смеси антибиотиков, которая получила название неомицинового комплекса, включающего неосицин А (неамин), неомицины В, С, D, Е и F. Неомицин, эффективный против многих грамположительных, грамотрицательных и кислотоустойчивых бактерий, производится и применяется и в настоящее время. Также представители вида *Streptomyces fradiae* используются в фармацевтической промышленности для получения тилозина – антибиотика, действующего на грамположительные и некоторые грамотрицательные микроорганизмы. Кроме того, штаммы *Streptomyces fradiae* обладают возможностью к синтезу таких антибиотиков, как фосфомицин и декамицин [41, 148].

Исследователями из Китая Xin Wenxiu et al., 2012, из морской воды был выделен штамм стрептомицетов, идентифицированный как *Streptomyces fradiae* PTZ0025. Из биомассы этого штамма были экстрагированы вещества, названные фрадимидинами А и В, которые показали антагонистические свойства против *Staphylococcus aureus*, а также выраженную противоопухолевую активность, значительно замедлив рост клеточной линии рака толстой кишки человека HCT-15 [209]. Также китайскими исследователями Lu Y. et al., 2009, из образцов почвы прибрежного города Лианиунганг, Китай, выделен морской стрептомицет, обладающий выраженной антагонистической активностью против

Bacillus cereus и *Escherichia coli*. Было определено, что штамм относится к роду *Streptomyces fradiae*, а вещество, синтезируемое им, является сизомицином [167].

В литературе имеют место сведения о соединении А54145, которое было получено из штамма *Streptomyces fradiae* NRRL 18158, изолированного из почвы Мексики. Это соединение относится к антибиотикам липопептидной природы, к группе даптомицина, оно активно в отношении грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* [141].

В ветеринарии широко используется лекарственный препарат тилозин, который является макролидным антибиотиком. Данный препарат используется в качестве добавок к кормам животных, а также при консервировании продуктов [41]. Исследованиями показано, что добавление тилозина к основному рациону свиней увеличило набор массы тела опытных животных на 2,5-3,0% по сравнению с контрольной группой с 7-й по 19-ю неделю исследования [149]. Исследователи Kim J. et al., 2016, показали, что под влиянием тилозина происходит увеличение соотношения микроорганизмов семейства *Firmicutes* над представителями семейства *Bacteroidetes*. Различные виды *Firmicutes* более эффективно используют имеющиеся питательные вещества в качестве источника энергии, с чем, по-видимому, связано анаболическое действие тилозина [159].

В последнее время в животноводстве широко применяются нативные формы химиопрепаратов микробиологического синтеза. В этих препаратах, помимо действующего антибиотического вещества, содержатся витамины, аминокислоты, ферменты, липидные фракции, макро- и микроэлементы. Эти вещества положительно влияют на процессы метаболизма в организме животных, что особенно важно для молодняка, а также ослабленных животных. В частности, широко применяется препарат фразидин-50, содержащий тилозин. Исследование действия данного препарата показали его высокую эффективность и экологическую безопасность при проведении профилактики и лечения многих заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных (острых расстройств органов пищеварения, пневмонии и др.), а также при терапии гнильцовых заболеваний пчел [46, 47]. В исследовании Aftabuddin S. et al., 2013, в качестве добавки к основному корму применяли биомассу штамма *Streptomyces fradiae*, выделенного из почвы мангровых лесов Бангладеш. В ходе эксперимента было показано, что масса опытной группы креветок *Penaeus monodon* в постличиночной стадии увеличилась на 102,3% по сравнению с массой контрольной группы. Исследователи связывают значительное увеличение массы креветок с тем, что штамм *Streptomyces fradiae* обладает способностью к синтезу ростстимулирующих факторов и антибиотиков,

которые, возможно, привели к очищению культуральной среды от патогенных микроорганизмов [102].

Кроме того, стрептомицетом *Streptomyces fradiae* выделяется в виде вторичного биологически активного метаболита цитотоксический препарат актиномицин [148], применяющийся в лечении онкопатологии. Для лечения острого лимфобластного лейкоза у детей в качестве химиотерапевтического средства применяется лекарственный препарат L-аспарагиназа. В окружающую среду это вещество в ходе своего метаболизма выделяют стрептомицеты. В промышленных масштабах для этого используется несколько их штаммов: *Streptomyces olivaceus* NEAE-11912, *Streptomyces parvus* NEAE-9513 и *Streptomyces broliosae* sp. nov. NEAE-11514 [138]. Продолжается поиск новых продуцентов для синтеза этого препарата. В исследовании [136] были изучены особенности нового штамма *Streptomyces fradiae* NEAE-82, способного синтезировать L-аспарагиназу. В результате был получен данный фермент с довольно выраженной каталитической активностью, что делает этот штамм привлекательным для получения лекарственного препарата в промышленных масштабах. Также в литературе имеют место данные о том, что один из штаммов *Streptomyces fradiae* Tü2717 синтезирует ангуциклический антибиотик урдамицин, проявляющий противораковую активность [140].

Китайскими исследователями Wang Y. et al., 2014, было проведено совместное культивирование штамма *Streptomyces fradiae* 007 со штаммом *Penicillium* sp. WC-29-5. Были синтезированы вещества – ароматические поликетиды, которые проявили цитотоксическую активность против опухолевых клеток линий HL-60 и H975. Кроме того, отмечено, что совместное культивирование этих микроорганизмов привело к синтезу биологически активных метаболитов, которые не образуются при изолированном росте культур, а также то, что они выжили в конкурентной среде [207].

В южных районах Индии из осадка морского дна выделили штамм *Streptomyces*, идентифицированный как *Streptomyces fradiae* PE7. Данный штамм синтезировал большое количество вещества PE7-C, активного против 18 микроорганизмов, вызывающих обрастание. Также соединение препятствовало прорастанию спор водорослей и прилипанию моллюсков. Химическая структура этого соединения была идентифицирована как кверцетин, который обладает выраженным антиоксидантным, а также радиопротекторным, регенеративным и противовоспалительным действием. Для кверцетина характерны свойства модуляторов активности ферментов, участвующих в деградации фосфолипидов (фосфолипаз, фосфогеназ, циклооксигеназ), влияющих на свободнорадикальные процессы [144, 172].

Учеными из США Thoden J.V. и Holden H.M., 2014, было проведено исследование фермента TylM1, диметилтрансферазы *Streptomyces fradiae*, осуществляющей синтез dTDP-микаминозы – компонента тилозина. dTDP-микаминоза относится к диметилированным аminosахарам, которые играют ключевую роль в биологической активности противораковых, антибактериальных, противогрибковых и противовирусных веществ, с которыми они связаны. Также исследование показало, что фермент TylM1 можно использовать для производства нового монометилированного сахара. Синтез редких сахаров ферментативным путем делает возможным получение новых углеводов с направленным действием [203].

Штамм MM456M-mF7 был выделен из осадка морской воды в районе побережья Сагами, Япония. Было определено таксономическое положение штамма. Он относится к виду *Streptomyces fradiae*. Из культуральной жидкости данного штамма были получены вещества, названные фрадиамином А и В. Фрадиамин А – сидерофор, фрадиамин В – его производная. Сидерофоры представляют собой железо-специфические хелатирующие агенты, которые обычно синтезируются микроорганизмами и растениями в условиях с низким содержанием железа. Они вытесняют патогены из среды обитания данных организмов, т.к. ограничивается биодоступность железа, которое имеет важное значение для роста, а также для образования биопленки. Кроме того, фрадиамин В был также запатентован как усилитель сладкого вкуса [199].

В препарате, полученном из *Streptomyces fradiae* 119, обнаружены такие ферменты, как лейцинамино- и карбоксипептидазы, сериновые протеазы, обладающие эффектом действия, аналогичным трипсину, химотрипсину и эластазе [39]. Также имеются данные о ряде штаммов *Streptomyces fradiae*, способных усваивать кератин – белок шерсти, рогов, волос и т.д. Эта способность весьма примечательна, т.к. шерсть и волосы устойчивы к воздействию большинства протеолитических ферментов. В частности, фирма «Merck» на основе одного из штаммов *Streptomyces fradiae* выпускает препараты с кератиназной активностью [176]. Из литературных данных известно, что штамм *Streptomyces fradiae* var. k11 эффективно гидролизует перья и волосы. Кроме того, была обнаружена его активность в отношении гидролиза ксилана, который является основным компонентом гемицеллюлозы растительной клетки, являющейся вторым по значимости полисахаридом в природе после целлюлозы. В данном исследовании из генома штамма *Streptomyces fradiae* var. k11 был выделен участок ДНК, отвечающий за синтез фермента. Полученный фермент показал высокую активность при широком диапазоне рН, устойчивость к другим

протеазам, что делает перспективным его применение в производстве хлеба, очистке хлопка и улучшении состава кормов для животных [165, 208].

1.4. Выводы по главе 1

1. Стрептомицеты отличаются разнообразным биохимическим составом биомассы, который может изменяться при разных условиях роста, особенно при изменении состава среды культивирования.

2. Стрептомицеты – перспективные продуценты БАВ. Возможности применения метаболитов стрептомицетов весьма широки, т.к. имеет место многообразие их химической структуры, высокая биологическая активность и эффективность в отношении ряда физиологических функций микро- и макроорганизмов.

3. Соединения, синтезируемые штаммами *Streptomyces fradiae*, применяются во многих отраслях: производство лекарственных препаратов, ветеринария, перерабатывающая промышленность, что актуально для дальнейшего изучения данного вида.

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

Направления решения проблемы следующие: определение биосинтетической способности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11; изменение состава среды культивирования для выявления потенциальных возможностей биосинтеза физиологически активных веществ; изучение перспектив применения биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

Цель работы: изучение культуральных свойств и биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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:

1. Изучение культуральных свойств, однородности и стабильности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11 на разных средах;
3. Исследование влияния веществ цианобактериального происхождения на способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 активно накапливать биомассу и синтезировать аминокислоты, физиологически активные липидные фракции и углеводы;
4. Исследование влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11 на количественные характеристики отдельных представителей микрофлоры кишечника теплокровных животных (белых крыс) в обычных условиях и при действии стресс-факторов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований, представленные в работе, были получены в течение 2014–2017 гг. в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микобиологии и Биотехнологии, лаборатории Фикобиотехнологии Института Микробиологии и Биотехнологии, виварии кафедры физиологии и санокреатологии ПГУ им. Т.Г. Шевченко и Бактериологической лаборатории СЭС г. Тирасполя.

2.1. Объект исследования

Объектом исследования являлся штамм стрептомицетов из Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов ИМБ (депонирован 27.10.2016): *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11. Культуру хранили двумя способами: методом периодических пересевов (каждые 3 месяца), используя агаризованные среды – среду Гаузе и овсяный агар, в холодильнике при температуре +4°C, а также в лиофильном виде.

При проведении скрининга объектами исследования выступали 236 штаммов стрептомицетов, выделенные из различных образцов чернозема центральной части Молдовы.

Кроме того, в экспериментах использовались штаммы фитопатогенных грибов (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*), бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*) из Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов ИМБ и условно-патогенных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) из коллекции Бактериологической лаборатории СЭС г. Тирасполя.

Сотрудниками лаборатории Фикобиотехнологии были предоставлены вещества из *Arthrospira platensis*: BioR и СПС_{Zn} (сульфатированные полисахариды с цинком).

Для выявления и идентификации стрептомицетов использовали метод посева из разведений почвенной суспензии на плотные питательные среды, в частности крахмало-аммиачный агар¹ [42]. Инкубирование посевов проводили в течение 2–3-х недель при температуре +27+28°C. Далее производили описание колоний стрептомицетов, обращая внимание на наличие и цвет воздушного и субстратного мицелия, растворимого пигмента, выделяемого в среду; консистенцию колоний; складчатость колоний (концентрическая или радиальная); консистенцию воздушного мицелия (мучнистая, бархатистая, порошковидная, пушистая). Морфологические признаки актиномицетов — строение

¹ растворимый крахмал –10,0, (NH₄)₂SO₄ –2,0, K₂HPO₄ –1,0, MgSO₄*7H₂O –1,0, NaCl –1,0, CaCO₃ –3,0, агар –15,0, солевой раствор –1,0 мл, вода дист.–1000 мл, рН=7,0–7,4.

колоний и мицелия, его ветвление, строение и расположение спороносцев, наличие спорангиев, склероциев, количество спор в цепочках на субстратном и/или воздушном мицелии — изучали, просматривая колонии актиномицетов, выросшие на плотной питательной среде в чашках Петри, при малом увеличении микроскопа. Диагностику и идентификацию актиномицетов проводили на основании культуральных, морфологических, физиологических и хемотаксономических признаков совместно с сотрудниками Института Микробиологии и Вирусологии им. Заболотного Д.К. НАН Украины с использованием «Определителя бактерий Берджи» (1997) [90].

Для описания колоний штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19) предварительно производили посев на агаризованные среды в чашки Петри: овсяный агар², среду Гаузе³, СР-Г⁴, среду Придхема-Готтлиба⁵, среду Чапека⁹. Для этого в стерильные чашки Петри разливали расплавленную агаризованную среду по 20,0-30,0 мл в каждую, затем с помощью стерильной пипетки вносили на поверхность среды суспензию спор, далее растирали стерильным шпателем. Чашки с засеянными средами помещали в термостат при температуре +27+28°C. Измерение диаметра колоний производили на 7, 14, 21 дни роста в десятикратной повторности. Культуральные признаки штамма изучали по характеру роста изолированных колоний 14-суточного возраста. Описание колоний, выросших на плотных питательных средах, производили, обращая внимание на следующие признаки: форма, размеры, цвет, поверхность, профиль, край, консистенция, структура колоний, а также на цвет воздушного и субстратного мицелия, который определяли по таблице цветов Бондарцева А.С. [22]. Форму цепочек спор изучали в световом микроскопе. Определение таких физиолого-биохимических характеристик, как использование различных источников углерода, а также пептонизацию и коагуляцию молока, гидролиз крахмала, восстановление нитратов, образование сероводорода, деструкцию целлюлозы и др., проводили согласно [27, 41].

2.2. Методы исследования

Определение продуктивности биомассы *Streptomyces spp.* В ходе проведения скрининга исследуемые штаммы выращивали на жидкой среде, используя инокулум, для получения которого суспензию спор вносили в конические колбы объемом 250 мл –

² овсяная мука – 40,0, агар – 20,0, дист. вода – 1,0 л, pH=7,2.

³ крахмал растворимый – 20,0, K₂HPO₄ – 0,5, MgSO₄ – 0,5, KNO₃ – 1,0, NaCl – 0,5, FeSO₄ – 0,01, агар – 30,0, дист. вода – 1,0 л, pH=7,2–7,4.

⁴ K₂HPO₄ – 0,5, KNO₃ – 1,0, NaCl – 0,2, MgCO₃ – 0,3, CaCO₃ – 0,5, FeSO₄ – 0,001, глюкоза – 20,0, агар – 20,0, дист. вода – 1,0 л, pH=7,2–7,4.

⁵ (NH₄)₂SO₄ – 2,64, KH₂PO₄ – 2,38, K₂HPO₄ – 5,65, MgSO₄ – 1,0, солевой раствор – 1,0 мл (CuSO₄ – 0,64, FeSO₄ – 0,11, MgCl – 0,79, ZnSO₄ – 0,15, дист. вода – 100,0 мл), глюкоза – 10,0, агар – 20,0, дист. вода – 1,0 л, pH=6,8–7,0.

колбы Эрленмейера – со средой Дюлоне⁶ и выращивали в течение 72 ч при +27°C на вибростоле (180-200 об/мин). Готовый инокулят вносили в колбы Эрленмейера с жидкой питательной средой (М-1⁷, R⁸, Чапека⁹, Дюлоне⁶ и др.). Культивирование вели при +27°C на вибростоле (180-200 об/мин) в течение 5 дней, после чего биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (5000 об/мин в течение 20 мин). Далее взвешиванием определяли массу мицелия стрептомицета, высушенную при +105°C до постоянного веса.

Определение липидного состава биомассы *Streptomyces spp.* Экстракцию внутриклеточных липидов из биомассы проводили методом Фолча [49] в модификации, описанной в работе [3]. В колбу Эрленмейера помещали 3,0 г сырой биомассы, далее смешивали с раствором хлороформа и спирта в соотношении 1:5. Колбу с содержимым фиксировали на вибрационном столе (180 обор/мин) на 20 минут, после доливали 27,0 мл хлороформа, далее колбу опять устанавливали на вибрационный стол (180 обор/мин) на 20 минут. Затем фильтровали содержимое колбы через фильтровальную бумагу, следующим шагом содержимое заливали в делительную воронку, добавляли воду в соотношении 1:5 и производили медленные колебательные движения для отделения этанола, затем сливали хлороформ с липидами в колбу. Так повторяли 5 раз. После раствор липидов в хлороформе фильтровали через безводный сульфат натрия. На роторном испарителе отгоняли хлороформ для получения суммарных липидов.

Качественный и количественный состав липидов определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Sorbfil” и денситометрическим методом, описанным в работе [70].

Определение аминокислотного состава биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. В комплексных биологических материалах определяются и связанные, и свободные аминокислоты. Для подготовки проб биомассы изучаемого штамма использовали метод гидролиза 6N-соляной кислотой [52]. Пробу взвешивали и количественно переносили в пробирки из пирекса или сиала, куда добавляли 6N-соляную кислоту в двукратном избытке. Пробирки запаивали, а затем комплексные пробы выдерживали в воздушном термостате при 110±10°C в течение 24 часов. После гидролиза пробирки охлаждали, содержимое пробирок количественно переносили и фильтровали. Кислоту в полученной жидкости испаряли в вакуумном роторном испарителе при 400°C

⁶ NaCl – 0,5, K₂HPO₄ – 0,2, CaCl₂ – 0,04, ZnSO₄*7H₂O – 0,001, FeSO₄*7H₂O – 0,001, MgSO₄ – 0,1, (NH₄)₂HPO₄ – 0,7, глюкоза – 2,0, дист. вода – 1,0 л, pH =7,0-7,2.

⁷ кукурузная мука – 20,0, CaCO₃ – 1,5, дрожжи – 5,0, дист. вода – 1,0 л, pH =7,0

⁸ кукурузная мука – 20,0, крахмал – 15,0, NH₄NO₃ – 7,0, K₂HPO₄ – 0,2, CaCO₃ – 5,0, NaCl – 3,0, дист. вода – 1,0 л, pH =6,8–7,0.

⁹ NaNO₃ – 2,0, K₂HPO₄ – 1,0, MgSO₄*7H₂O – 0,5, KCl – 0,5, FeSO₄ – 0,01, глюкоза – 20,0, дист. вода – 1,0 л, pH =7,0–7,3.

до pH=2,2. Аминокислотный состав полученной биомассы определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе ААА-339 М „Microtehná”(Чехия).

Определение углеводного состава биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 с антроновым реактивом. Метод основан на расщеплении сложных углеводов до моносахаров в сильноокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием гидроксиметилфурфурола, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета. Интенсивность образовавшейся окраски прямо пропорциональна содержанию сахаров в реакционной среде.

В пробирки наливали по 0,5 мл раствора, содержащего 20–200 мкг биомассы (испытуемая проба), и 50, 100 и 200 мкг глюкозы (для построения стандартной кривой). Для контроля на реактивы в две пробирки наливали по 0,5 мл воды. Во все пробирки приливали по 5 мл антронового реактива. Добавление реактива следует проводить быстро, так, чтобы струя реактива попадала в центр проб. Для этого используют пипетку с широким носиком. Смесь немедленно тщательно перемешивали и помещали на 10-15 минут в водяную баню комнатной температуры, а затем переносили в кипящую водяную баню на 15 минут. По окончании нагревания пробирки быстро охлаждали в проточной воде и оставляли в темном месте на 30 минут. Окрашенные растворы колориметрировали на фотоэлектроколориметре с красным фильтром (620 нм) в кювете толщиной 0,5 см. Количество глюкозы в испытуемых пробах рассчитывали по стандартной кривой, которую строили для каждой серии определений [62, 133].

Антимикробные свойства штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Антимикробную активность определяли методом агаровых блочков [41]. Для выявления антимикробных свойств штамма использовали агаризованные питательные среды R⁴, Чапека⁵, Гаузе⁷. Исследуемый штамм высевали сплошным газоном, инкубировали при температуре +27+28°C в течение 14 суток. Затем агаровые блочки с газоном актиномицета переносили на поверхность агаризованной среды, засеянной тест-организмом. На одной чашке Петри располагали 5-6 агаровых блочков. Чашки выдерживали 24 часа при температуре +4°C в холодильнике для диффузии антибиотических веществ в толщу агара. После инкубировали в термостат при температуре, оптимальной для роста тест-микроорганизма, на сутки и более в зависимости от скорости его роста, далее измеряли диаметр зон задержки роста тест-микроорганизмов в мм вокруг агаровых блочков. Степень активности штамма с антагонистической активностью оценивали по шкале Биргер [84].

Оптимизация состава среды культивирования штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Штамм культивировали в течение 5 дней на вибрационном столе при температуре +27°C на жидкой питательной среде R⁴ (контроль). Дополнительными компонентами в среде культивирования R⁴ являлись вещества из цианобактерий *Arthrospira platensis* [8, 9]. Использовали препарат BioR, который добавляли в среду в количестве 0,5; 1,0; 10,0; 20,0 и 50,0 г/л. Также добавляли препарат СПС_{Zn} в количестве 50,0; 100,0; 200,0; 300,0 и 500,0 г/л. Количество биомассы и общих липидов, качественный состав общих липидов, количество отдельных фракций, а также аминокислотный состав определяли по методикам, описанным в работах [3, 52, 69].

Работа с животными. Опыты на животных проводились на самцах и самках белых лабораторных крыс линии *Wistar*. Выбранных животных делили на опытные и контрольную группы. В течение 3-х месяцев вместе с основным рационом питания опытным животным добавляли высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированного на среде R (сушили биомассу при комнатной t°C до постоянного веса), а также биомассу, полученную на комплексной среде R с добавлением препарата BioR в концентрации 0,1%, или культуральную жидкость в терапевтической дозе (250 мг/кг или 10-12 мл/кг массы тела соответственно), кроме того, животные употребляли их на всем протяжении эксперимента и в течение восстановительного периода. Контрольные животные получали обычный рацион питания [38]. Изменение массы тела животных регистрировали каждые 7 дней на электронных лабораторных весах модели А-2500 фирмы “Axis” (Польша).

Определение токсикологических свойств биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Токсические свойства биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 оценивали с помощью методов определения острой и субхронической токсичности веществ, возможных побочных эффектов и отдаленных последствий согласно «Методическим указаниям по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» [60].

Для определения острой токсичности однократно внутрижелудочно через зонд вводили разведенную водой биомассу в разных концентрациях, а также культуральную жидкость в разном объеме. Далее наблюдали за внешним видом животных, состоянием кожного покрова и их поведением.

Субхроническую токсичность определяли путем добавления высушенной биомассы к основному рациону питания животных в трехкратной терапевтической дозе в

течение месяца. Контрольным животным давали стандартный рацион питания. Производили регистрацию токсического действия по количеству погибших животных и картине интоксикации. Ежедневно наблюдали за общим состоянием и внешним видом животных, а также за их поведением (аппетит, возбуждение или угнетение), оценивали функциональные показатели органов пищеварения и мочеотделения. Показателем продуктивности служил прирост массы тела животных. Взвешивание проводили индивидуально до назначения препарата и по окончании опыта. На основании полученных данных высчитывали средний прирост массы тела животного. Отмечали клинические симптомы отравления, количество заболевших и павших животных.

Оценка влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на плодовитость подопытных животных. Изучение фертильности проводили следующим образом: к самкам контрольной и опытной групп подсаживали самцов соответствующей группы опыта (в соотношении 2:1) на 2-е недели. В течение времени спаривания и беременности животные опытных групп получали к основному рациону питания биомассу исследуемого штамма. Фиксировали дату родов, количество крысят в помете и массу тела новорожденных крысят в опытной и контрольной группах. Вычисляли 3 основных показателя, дающих количественную характеристику гонадотропных эффектов токсиканта: индекс фертильности = (число беременных самок/общее число самок)*100; индекс гестации = (число родивших самок/число беременных самок)*100; индекс плодовитости = число родившихся крысят/число родивших самок. Отмечали влияние биомассы на эмбриональное развитие и генеративную функцию животных путем обнаружения аномалий и уродств после их рождения [58].

Методы стрессирования подопытных животных. Моделировали тепловой стресс путем помещения опытных животных в термостат при температуре +34+36°C в течение 2 часов. Имобилизационный стресс воспроизводили путем фиксации животных на спинке с привязанными лапками на 2 часа. Действию стрессорных факторов животные контрольной и опытной групп подвергались в течение 2 недель, после чего следовал период восстановления. В течение опытного периода проводилось постоянное наблюдение за внешним видом животных, поведением, выделениями, контролировалась масса тела.

Метод выработки классических и инструментальных условных рефлексов. В работе использовали метод выработки искусственного экстрорецепторного рефлекса, а именно, условной двигательной реакции избегания болевого стимула. Выбатывали классический оборонительный рефлекс избегания с короткоотставленным аверсивным

(отрицательным) подкреплением электрическим током с латентным периодом в пять секунд, то есть крысы обучались избегать влияния электрического тока [43].

Методика выработки условного рефлекса была следующей: крыса помещалась в освещенную секцию, где адаптировалась в течение одной минуты. Затем освещение секции, где находилась крыса, прекращалось, одновременно свет включался в соседней секции. Электрокожное раздражение (4-6 мА, 5-7 кГц) наносили животным по окончании светового сигнала (через 5 с) через металлический пол камеры, соединенный с электростимулятором. Ежедневно предъявлялось по 10 сочетаний с интервалом 40 ± 10 с между сочетаниями. Условным рефлексом считалось перемещение крысы в безопасный отсек без подкрепления отрицательным стимулом. Производили подсчет доли условно-рефлекторных реакций в общем количестве побегов каждого животного [75]. Если крыса не показывала условный рефлекс, регистрировался латентный период перехода животного из темного отделения в светлое отделение.

Исследование изменения количества отдельных видов кишечной микрофлоры под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Для исследования количественного и качественного состава кишечной микрофлоры предварительно отбирались образцы кишечного содержимого. Для этого производили сбор фекалий опытных и контрольных животных в стерильные бюксы на 3-й, 7-й и 90-й день от начала применения высушенной биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Также отбор проб производили после окончания стрессирования животных: как после теплового, так и иммобилизационного стрессов.

Для приготовления исходной суспензии пробу из содержимого кишечника крыс весом в 1,0 г вносили в агаризованный (0,1%) тиогликолево-фосфатный буфер, обеспечивающий выживание анаэробных микроорганизмов, в соотношении 1:9. Из полученной суспензии готовили последовательные десятикратные разведения в фосфатно-тиогликолевом буфере от 10^1 до 10^{10} . Подготовленные разведения использовали для посева на дифференциально-диагностические и селективные среды для количественного учета анаэробных микроорганизмов: мясо-пептонный агар, 5% кровяной агар, среда Эндо, Блаурокка, Сабуро, Лактобакагар и пр.

Культуры, выросшие на питательных средах при высеве из наибольших разведений, подвергали групповой (анаэробные, неспорообразующие бактерии), родовой (лактобациллы, фекальные стрептококки, стафилококки, неферментирующие грамотрицательные энтеробактерии) идентификации. Таксономическую принадлежность к вышеуказанным группам выделенных чистых культур оценивали на основании роста

бактерий в аэробных и анаэробных условиях, отношения к окраске по Граму, характеру роста на селективных средах, биохимической и серологической идентификации, согласно определителю Берджи. Плотность популяции определяли путем подсчета микроорганизмов в 1 г испражнений (КОЕ/г).

Для аэробных микроорганизмов использовали разбавитель общего назначения – пептонно-солевой раствор. По истечении сроков инкубации посевов подсчитывали количество колоний, с характерными признаками роста, выросших на чашках Петри. Подтверждение осуществляли пересевом на дифференциально-диагностические среды, а также путем выявления клеток типичной морфологии при микроскопии.

Результаты оценивали по каждой пробе и каждому выявленному микроорганизму отдельно. Полученные результаты содержания микроорганизмов пересчитывали в колониеобразующие единицы на 1 г (см^3) исследуемого материала (КОЕ/г).

Из навески исследуемого материала готовили исходное и ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить предполагаемое количество бактерий в 1 г (см^3). Количество бактерий в 1 г определяли по результатам посева наибольшего (конечного, последнего, предельного) разведения (менее концентрированного), в котором были обнаружены микроорганизмы. При подсчете учитывали степень разведения.

Для выявления общего микробного числа (ОМЧ) использовали мясо-пептонный агар (МПА), который предназначен для культивирования различных микроорганизмов. Питательная среда в сухом виде готовится по инструкции, указанной на этикетке.

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов посевом в агаризованную питательную среду из 1, 3 и 5 разведения исследуемого материала по 1 см^3 высевали в 3 чашки Петри (для каждого разведения своя чашка). Посевы заливали МПА и инкубировали при $+30^\circ\text{C}$ в течение 72 ч в аэробных условиях.

Для определения количества колиформных бактерий применяли сухую питательную среду Эндо. Среда предназначена для выделения и дифференциации энтеробактерий. Среда готовится по инструкции, указанной на этикетке. Исследуемый материал по 0,05 и 0,001 мкл в 3, 5 и 7 разведении наносили на поверхность среды в две чашки Петри, каждая из которых была разделена на 3 зоны. Посевы инкубировали при $+37^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Изучение посевов проводили через 48 ч. Для подтверждения принадлежности выросших микроорганизмов к колиформным бактериям делали микроскопию окрашенных по Граму мазков.

Для определения количества энтеробактерий использовали МПА, полужидкий МПА, мясо-пептонный бульон (МПБ) с глюкозой. Эти среды использовали для культивирования микроорганизмов. Из дифференциально-диагностических сред применяли висмут-сульфит агар (ВСА), среду Плоскирева и среду Эндо. Они предназначены для выделения и дифференциации энтеробактерий. Исследуемый материал по 0,05 и 0,001 мкл наносили на поверхность сред (по две чашки Петри на каждую среду), каждая из которых была разделена на 3 зоны. 3, 5 и 7 разведение наносили на поверхность среды Эндо; 1, 3 и 5 разведение наносили на поверхность сред ВСА и агар Плоскирева. Посевы инкубировали при +37°C в течение 48 ч. Для биохимической идентификации и изучения свойств энтеробактерий использовали трехсахарный агар (TSI агар), агар Кристенсена с мочевиной, среды Гисса с углеводами (с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, сорбитом, дульцитом, мальтозой, маннозой, ксилозой, рамнозой, галактозой, инозитом), триптонную воду. Дополнительно для определения были использованы железоглюкозо-лактозный агар с мочевиной (среда Олькеницкого), агар Клигlera, цитратный агар Симмонса, среда Кларка, среда Хью-Лейфсона. Все питательные среды в сухом виде готовились по инструкциям на этикетке. Реактивы Эрлиха или Ковача предназначены для постановки индольного теста. Дополнительно использовали оксидазные полоски, ONPG-диски.

После инкубирования посевов на дифференциально-диагностических средах проводили изучение морфологии, культуральных, биохимических признаков межродовой, родовой и внутривидовой принадлежности к семейству *Enterobacteriaceae*. Из выросших колоний проводили оксидазный тест, ONPG-тест. Морфологию выделенных культур определяли микроскопированием окрашенных по Граму мазков. Колонии, подлежащие дальнейшему изучению характера роста, пересевали в TSI агар, в среду Олькеницкого, в агар Клигlera, в среды Гисса, в агар Кристенсена. Делали пересев в МПА, в полужидкий МПА, в триптонную воду, в МПБ с глюкозой, в агар Симмонса, в среду Кларка. Делали посев в среду Хью-Лейфсона, разлитую в 2 пробирки, 1 из которых затем заливали вазелиновым маслом. Посевы инкубировали при +37°C в течение 24 ч. Исключения составляют: среду Кларка и триптонную воду инкубировали при +35°C 48 ч, МПБ с глюкозой – при +37°C в течение 48 ч, среду Хью-Лейфсона – при +37°C до 4 суток, агар Симмонса – при +34°C до 4 суток, МПА – при +35°C до 14 суток. После инкубирования посевов проводили учет результатов на TSI агаре, среде Олькеницкого, агаре Клигlera по ферментации сахаров, образованию сероводорода, газообразованию и утилизации мочевины. На средах Гисса изучали «цветной ряд». Расщепление мочевины определяли на

агаре Кристенсена. Определяли подвижность в полужидком МПА. На триптонной воде учитывали индольный тест с добавлением реактивов Эрлиха или Ковача. Определение образования ацетоина (реакция Фогес-Проскауера) проводили на МПБ с глюкозой после добавления раствора α -нафтола и раствора гидроокиси калия. Утилизацию цитратов определяли на агаре Симмонса. Окислительно-ферментативную реакцию учитывали на среде Хью-Лейфсона. Разжижение желатина рассматривали на МПА, у бактерий рода *Proteus* выявляли способность к роению. Тест с метиловым красным проводили на среде Кларка.

Для определения количества дрожжевых и плесневых грибов в исследуемой пробе применяли агар Сабуро. Среда готовится по инструкции, указанной на этикетке. Из подготовленных 1, 3 и 5 разведений исследуемой пробы объем 1 см³ высевали в три чашки Петри (каждое разведение в отдельную чашку Петри). Посевы заливали агаром Сабуро. Посевы термостатировали при +24°C в течение 5 суток. После инкубации проводили учет и обработку результатов посевов.

Для выявления и определения количества бактерии рода *Bifidobacterium* в анализируемом материале использовали модифицированную печеночную среду Блаурокка. Питательная среда предназначена для культивирования и выделения бифидобактерий. Среду готовили в соответствии с ГОСТ. Приготовленные 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 разведения высевали методом глубинного посева в пробирки с полужидкой селективной питательной средой. Посевы инкубировали в анаэробных условиях при +37°C в течение 72 ч. После инкубации проводили подсчет всех типов выросших колоний, имеющих морфологическое сходство с колониями бактерий рода *Bifidobacterium* в пробирках с тремя конечными разведениями. Для подтверждения наличия бактерий рода *Bifidobacterium* методом микроскопирования готовили мазки, окрашивали по Граму. Определяли наличие каталазы. Подсчет колоний в полужидких средах производили путем умножения числа выросших колоний на соответствующее разведение. При отсутствии дифференцированного роста колоний учитывали результаты по предельному разведению, в котором визуально выявляли признаки роста бактерий, и при подтверждении микроскопией.

Для выявления и определения количества бактерий рода *Lactobacillus* использовали среду Лактобакагар. Среда готовится по инструкции, указанной на этикетке. Из подготовленных 5, 7 и 9 разведений исследуемой пробы объемом 1 см³ высевали в три чашки Петри (каждое разведение в отдельную чашку Петри). Посевы заливали Лактобакагаром и термостатировали при +37°C в течение 72 ч. После инкубации

проводили обработку и подсчет результатов посевов. Для подтверждения принадлежности выделенных колоний к лактобактериям проводили микроскопирование и тест на отсутствие каталазы.

Для выделения и подсчета *Escherichia coli* применяли 7-Тергитол агар. Для подтверждения выделенных культур применяли триптонную воду, триптон-соевый агар (ТСА). Среды готовились по инструкции, указанной на этикетке. Из 3, 5 и 7 разведений исследуемого материала по 0,05 мкл и 0,001 мкл высевали на поверхность 7-Тергитол агара в четыре чашки Петри, каждая из которых была разделена на 3 зоны. Посевы инкубировали при +37°C и +44°C до 48 ч. Для обнаружения *Escherichia coli* использовали инкубацию посева при +44°C, что способствовало подавлению роста сопутствующих микроорганизмов. После окончания инкубации учитывали выросшие характерные колонии микроорганизмов. Для подтверждения наличия в пробе *Escherichia coli* проводили пересев характерных колоний микроорганизмов в чашки Петри на ТСА и в триптонную воду. Инкубировали посевы на ТСА при +37°C в течение 24 ч. и выполняли оксидазный тест.

Для выделения и подсчета кишечных энтерококков применяли агар Сланетца-Бартли, для подтверждения выделенных культур применяли желчный эскулиновый азидный агар. Среды готовились по инструкции, указанной на этикетке. Из 1, 3, 5 и 7 разведений исследуемого материала по 0,05 мкл и 0,001 мкл высевали на поверхность агара Сланетца-Бартли в две чашки Петри, каждая из которых была разделена на 4 зоны. Посевы инкубировали при +37°C до 48 ч. При наличии в посевах типичных колоний энтерококков для подтверждения пересевали на желчный эскулиновый азидный агар. Посев инкубировали при +44 °C в течение 2 ч.

Интерпретировали результаты исследований подтверждением культур с помощью определителя бактерий [90].

Методы определения всасывания пищевых веществ в тонкой кишке в условиях хронического стрессирования. Для исследования всасывания углеводов в тонкой кишке по методу single-pass intestinal perfusion (SPIP) *in situ* с модификациями животных наркотизировали внутривенным введением уретана (1,5 г/кг), затем помещали на нагретую до +37°C площадку для поддержания температуры тела и проводили лапаротомию, далее производили операцию по методу Тири-Велла в модификации А.М. Уголева и сотр. [86]. После извлечения проксимального отдела тонкой кишки изолировали отрезок длиной 20 см на расстоянии 15 см дистальнее двенадцатиперстной кишки без повреждения кровеносных сосудов брыжейки. В оба конца отрезка тонкой

кишки вставляли полиэтиленовые канюли с внутренним диаметром 3 мм, которые фиксировали лигатурами. Канюли выводили через узкие отверстия в мышцах и коже, после чего на брюшную стенку накладывали швы. Канюлированный сегмент тонкой кишки промывали раствором Рингера (+37°C) до выхода химуса, а затем канюли соединяли с перфузионной системой. В дни опыта перфузию изолированной петли тонкой кишки проводили в тех же условиях растворами тестируемых субстратов. До перфузии изолированный отрезок тонкой кишки промывали раствором Рингера с помощью шприца. Затем фистулы соединяли с перфузионной системой. Перфузия проводилась с помощью многоканального перистальтического насоса «Zalimp» (Польша), обеспечивающего стабильную, близкую к физиологической, скорость перфузии (около 0,5 мл/мин). Раствор, поступающий в отрезок тонкой кишки, предварительно подогревался до +38°C. Для перфузии изолированного участка тонкой кишки использовали растворы глюкозы с инициальной концентрацией от 12,5 до 110 мМ и фруктозы с инициальной концентрацией от 12,5 до 75 мМ. Субстраты готовили на растворе Рингера (рН=7,4) с таким расчетом, чтобы осмотичность перфузионного раствора составляла около 300мОсм. Эксперимент продолжался 120-180 минут. Пробы полученного перфузата для анализа собирали в центрифужные пробирки на холоде с интервалом 10 минут через 30 минут после начала перфузии, когда устанавливалась стабильная скорость всасывания.

Концентрацию глюкозы в перфузионных растворах определяли с помощью современных наборов “Bio-Test” (Чехия). В основу определения содержания глюкозы положен модифицированный глюкозооксидазный метод Триндера. Для определения концентрации фруктозы использовали колориметрический мышьяково-молибденовый метод Нельсона в модификации А.М. Уголева и Н.Н. Иезуитовой и антроновый метод.

Определение истинных кинетических констант активного транспорта глюкозы (K_1 и J_{max}) в изолированной петле тонкой кишке проводили по методу [36]. Принимали, что всасывание глюкозы в тонкой кишке может быть описано классическим уравнением Михаэлиса-Ментен плюс ненасыщаемый (диффузионный) компонент:

$$J_{a=} \frac{J_{max} \cdot C_m}{K_1 + C_m} + k_d \cdot C_m \quad (2.1)$$

где J_a – скорость всасывания глюкозы, C_m – концентрация глюкозы на пищеварительно-всасывательной поверхности, J_{max} – максимальная скорость транспорта глюкозы, K_1 – константа Михаэлиса для активного транспорта, K_d – константа скорости пассивной диффузии глюкозы через эпителий. Предварительно вычисляли значения константы

скорости пассивной диффузии – k_d (см /мин, в расчете на 1 см длины кишки) по данным опытов с перфузией петли тонкой кишки в присутствии флоридзина (1 мМ) по формуле:

$$k_d = \frac{J_{a110}}{C_L \cdot L} \quad (2.2)$$

где J_{a110} – скорость всасывания глюкозы (мкмоль/мин) в кишечной петле при исходной концентрации субстрата 110 мМ в присутствии флоридзина, C_L - концентрация глюкозы в полости кишки (~110 мМ), L - длина изолированной петли, см.

Определяли оценочную величину диффузионного сопротивления презепителиального слоя (R_{PL}') в расчете на 1 см длины кишки по (мин/см²) формуле:

$$R_{PL}' = \frac{L}{v \cdot \ln(C_1 / C_2)} \quad (2.3)$$

где C_1 и C_2 – концентрации глюкозы на входе и выходе изолированной петли тонкой кишки соответственно, мМ, L – длина изолированной петли, v – объёмная скорость перфузии, мл/мин. С учетом полученного значения R_{PL}' вычисляли оценочные промежуточные значения кинетических констант всасывания глюкозы (K_t' и J_{max}') методом двойных обратных величин с использованием прямой линейной регрессии.

Для этого сначала определяли средние логарифмические значения концентрации субстрата в полости кишки, $C_{L \log}(i)$, и на пищеварительно-всасывательной поверхности, $C_{M \log}(i)$ для каждой i -й перфузии по формулам:

$$C_{L \log}(i) = \frac{C_1(i) - C_2(i)}{1_n [C_1(i) / C_2(i)]} \quad (2.4)$$

$$C_{M \log}(i) = C_{L \log}(i) - J_a(i) \cdot R_{PL}' \quad (2.5)$$

где $C_1(i)$ и $C_2(i)$ – концентрации глюкозы (мМ) в исходном и оттекающем перфузатах соответственно при i -й перфузии, $J_a(i)$ – скорость всасывания глюкозы в расчете на 1 см длины кишки при i -й перфузии [мкмоль/мин(мин-см)], R_{PL}' – промежуточное значение диффузионного сопротивления презепителиального слоя, $i = 1, 2, \dots, n$ – порядковый номер перфузии.

Затем вычисляли оценочные (промежуточные) значения кинетических констант всасывания глюкозы (K_t' и J_{max}') по формулам:

$$K_t' = \frac{B_1 / B_2}{M_y - B_1 / B_2 \cdot M_x} \quad (2.6)$$

$$J_{max}' = \frac{1}{M_y - B_1 / B_2 \cdot M_x} \quad (2.7)$$

где

$$B_{1i} = \sum [X(i) - M_x] \cdot [Y(i) - M_y] \quad (2.8)$$

$$B_{2i} = \sum [X(i) - M_x] \cdot [Y(i) - M_x]^2 \quad (2.9)$$

$$X(i) = \frac{1}{C_{M \log}(i)} \quad (2.10)$$

$$Y(i) = \frac{1}{C_j(i)/L} \quad (2.11)$$

$$M_x = \frac{\sum X(i)}{n} \quad (2.12)$$

$$M_y = \frac{\sum Y(i)}{n} \quad (2.13)$$

После подстановки полученных значений K'_t и J'_{max} в уравнение Михаэлиса-Ментен вычисляли теоретические значения скоростей всасывания глюкозы при различных исходных концентрациях субстрата и определяли сумму квадратов отклонений этих скоростей от соответствующих экспериментальных значений.

Затем методом итераций путей пошагового уменьшения значений R_{PL}' и последующего вычисления новых значений K'_t и J'_{max} определяли значения диффузионного сопротивления презепителиального слоя (R_{PL}') и кинетических констант K_t и J_{max} , при которых сумма квадратов отклонений расчетных (теоретических) значений скоростей всасывания глюкозы была минимальной от соответствующих значений, полученных в эксперименте.

Статистический анализ данных. Математический анализ данных был выполнен при помощи программы Microsoft Excel 2010. Все экспериментальные данные были обработаны с помощью статистического анализа, при этом были использованы следующие методы: определение средней величины и среднего квадратичного отклонения, определение достоверности различия по критерию Стьюдента, определение средней ошибки. Впоследствии вычисленный критерий Стьюдента сопоставляли с табличным и находили вероятность P ($P = 1 - g$, g – вероятность, с которой различие верно), с которой различие может быть ошибочно, т.е. уровень значимости (0,05) [38].

2.3. Выводы к главе 2

1. В качестве объекта исследования была использована культура, относящаяся к порядку *Actinomycetales* Buchanan 1918, семейству *Streptomycetaceae* Waksman et Henrici 1943, роду *Streptomyces* Waksman et Henrici 1943, виду *fradiae* (Waksman et Curtis 1916) Waksman et Henrici 1948, хранящаяся в Национальной Коллекции Непатогенных

Микроорганизмов ИМБ, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. При проведении скрининга объектами исследования выступали 236 штаммов стрептомицетов, выделенных из различных образцов чернозема центральной части Молдовы. Также были использованы штаммы фитопатогенных грибов (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*), бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*) из Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов ИМБ и условно-патогенных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) из коллекции Бактериологической лаборатории СЭС г. Тирасполя.

2. Методы определения биосинтетической активности (накопление биомассы, липидов, аминокислот, углеводов) позволили определить возможности исследуемого штамма к синтезу таких биологически активных веществ, как липиды, аминокислоты.

3. Методы определения антимикробной активности сделали возможным определение антагонистических свойств штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

4. Использование методов работы с животными предоставило возможность для оценки влияния биомассы выбранного штамма на микро- и макроорганизмы.

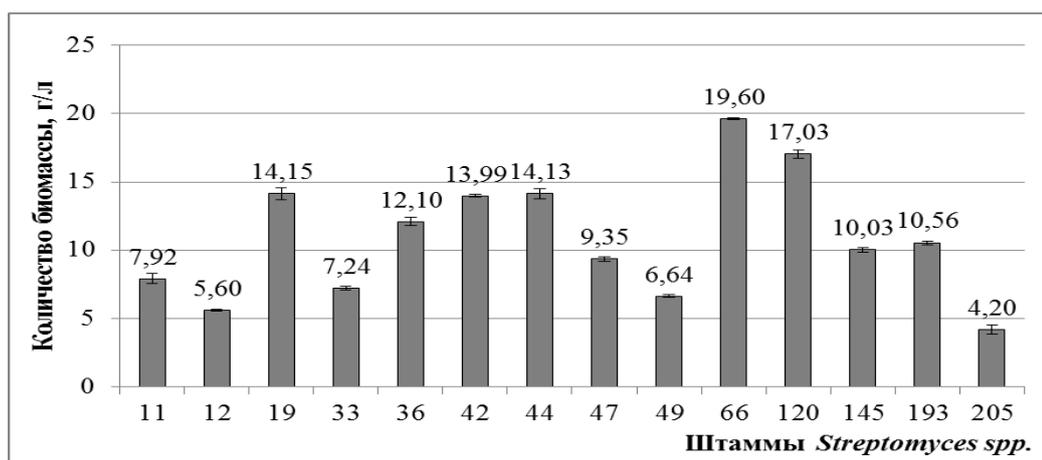
3. МОРФО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-Ас-11

3.1. Особенности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces* sp. 19) накапливать биомассу и липиды при росте на средах разного состава

Известно, что скрининг почвенных стрептомицетов, в основу которого положены определенные критерии, позволяет исследователям выявить наиболее перспективные штаммы. В этой части работы изложены результаты изучения сравнительной биосинтетической активности штаммов стрептомицетов, обитающих в почве центральной части Республики Молдова.

Из почвенных образцов центральной части Молдовы на крахмал-аммиачном агаре были выделены 236 штаммов микроорганизмов. После посева на классические минеральные среды нами были определены культуральные признаки по общепринятым методикам [22, 32, 41, 42, 45, 54]. Полученные результаты позволили отнести изученные штаммы к роду *Streptomyces* [54].

Далее нами было проведено культивирование исследуемых штаммов на жидкой комплексной среде М-1 (источник углерода – кукурузная мука) для определения их способности накапливать биомассу, что является одним из признаков биосинтетической активности штамма. Анализ данных по накоплению биомассы различными штаммами при росте на среде М-1 показал, что наибольший интерес представляют штаммы *Streptomyces* spp. 19, 44, 66, 120, количество биомассы которых на этой комплексной среде варьирует от 14,13 до 19,60 г/л (Рисунок 3.1).



Примечание: $P < 0,05$

Рис. 3.1. Накопление биомассы различными штаммами стрептомицетов при росте на комплексной среде М-1, г/л

Затем исследовали особенности штаммов стрептомицетов активно накапливать биомассу при росте на разных средах. Для этого проводили культивирование на четырех

средах (2 комплексные: М-1 и R и 2 минеральные: Чапека и Дюлоне). Исследуемые штаммы культивировали на жидких средах, используя предварительно выращенный инокулум. Полученные результаты представлены в таблице 3.1.

Таблица. 3.1. Накопление биомассы стрептомицетами при росте на комплексных и минеральных средах, г/л

Штаммы <i>Streptomyces spp.</i> \ Среда	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

Примечание: P<0,05

Для изучения продуктивности штаммов при различных условиях роста и последующего отбора более перспективных были проведены эксперименты по культивированию исследуемых штаммов на питательных средах разного состава, что выявило следующий факт: накопление биомассы на комплексных средах (М-1 и R) в 2-3 раза превышает накопление биомассы на классических синтетических средах Чапека и Дюлоне. В частности, это наблюдалось при культивировании штаммов 19, 33, 36, 66. Наибольшая продуктивность наблюдалась у штамма *Streptomyces sp.* 66: на комплексной среде М-1 выход биомассы составил 19,62±0,07 г/л, а на среде R – 18,72±0,14 г/л. У штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19) количество биомассы при росте на среде М-1 было 14,15±0,21 г/л, а на среде R – 13,46±0,52 г/л. Минимальная продуктивность при росте как на комплексных, так и на синтетических средах наблюдалась у штамма *Streptomyces sp.* 205: 4,21±0,11 г/л – при росте на комплексной среде М-1, 3,85±0,09 г/л – на комплексной среде R, 3,05±0,18 и 4,10±0,16 г/л – при росте на синтетических средах Чапека и Дюлоне соответственно. Невысокую биосинтетическую активность показали практически все штаммы при росте на синтетической среде Дюлоне (Таблица 3.1).

Как видно, наибольшее количество биомассы образуется при росте на комплексных средах (R и М-1) [19]. Из изученных штаммов наибольший интерес представили штаммы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19) и *Streptomyces sp.* 66.

Далее была оценена способность исследуемых штаммов к липидообразованию. Экстракцию внутриклеточных липидов из биомассы проводили методом Фолча в модификации, описанной в работе [2]. В результате проведенных исследований были получены данные, которые представлены в таблице 3.2.

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

Штаммы <i>Streptomyces spp.</i>	Среда	М-1	Р	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

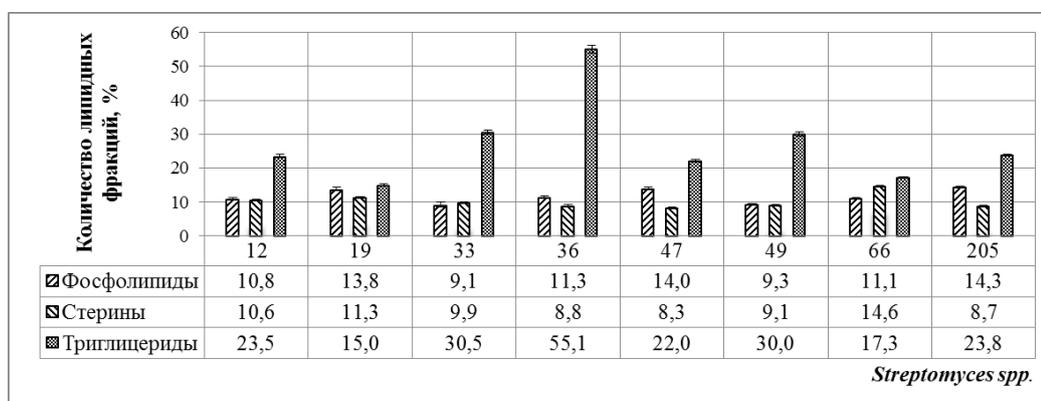
Примечание: P<0,05

Как видно из данных, представленных в таблице 3.2, наибольшее количество липидов содержится в биомассе штамма *Streptomyces sp.* 47 при росте на комплексных средах М-1 и R: 14,30±0,3 и 18,69±0,87% соответственно, при этом была выявлена низкая биосинтетическая активность в отношении накопления биомассы: при росте на среде М-1 количество биомассы составило 9,35±0,49 г/л, а на среде R – 3,53±0,04 г/л (Таблица 3.1). Также в биомассе штамма *Streptomyces sp.* 49 содержится 13,51±0,17 и 11,41±0,50% липидов при культивировании на комплексных средах М-1 и R соответственно. При этом наблюдали достаточно низкий выход биомассы при росте штамма на этих средах: 6,64±0,42 г/л – на среде М-1, 7,93±0,53 г/л – на среде R (Таблица 3.1). У штамма *Streptomyces sp.* 66 отметили более выраженное накопление липидов в биомассе при росте на синтетических средах: 10,81±0,39% – на среде Чапека и 8,94±0,29% – на среде Дюлоне, хотя выход биомассы при росте на этих средах составил 6,32±0,15 и 5,83±0,19 г/л соответственно (Таблица 3.1). Оптимальное соотношение продуктивности биомассы и способности к липидообразованию при росте на комплексных средах выявлено у штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19). При культивировании данного штамма на комплексных средах М-1 и R накопление биомассы составило 14,15±0,21 и 13,46±0,52 г/л (Таблица 3.1), а количество липидов биомассы – 12,11±0,27 и 12,85±0,55%, соответственно.

Итак, на данном этапе скрининга из 236 штаммов стрептомицетов, выделенных из почвы центральной части Молдовы, были выявлены штаммы, способные накапливать биомассу в большем количестве, чем другие, также оценена способность этих штаммов к синтезу липидов. Исследования показали, что штаммы стрептомицетов, выделенные из почв центральной части Молдовы, обладают способностью к накоплению биомассы и липидов в ней, особенно высокой при культивировании на комплексных средах. Так, наибольший выход биомассы составил почти 20,0 г/л, а количество липидов в биомассе разных штаммов – от 2,22 до 18,69%. Культивирование на синтетических средах Чапека и Дюлоне выявило более низкую биосинтетическую активность исследуемых штаммов: наибольшее количество биомассы составило $6,32 \pm 0,15$ г/л, а количество липидов – от 3,12 до 10,81%.

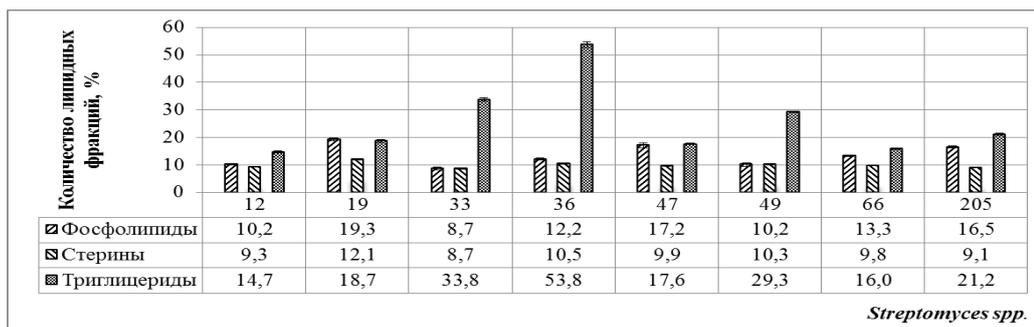
Для выявления штаммов, синтезирующих физиологически активные липидные фракции (ФЛ и СТ), определяли фракционный состав липидов биомассы, полученной при культивировании исследуемых штаммов на комплексных (М-1 и R) и синтетических (Чапека и Дюлоне) средах.

Как видно из данных, представленных на рисунках 3.2–3.5, количество фосфолипидной фракции было наибольшим в липидах биомассы штаммов *Streptomyces spp.* 12, 19, 36, культивируемых на синтетических средах Чапека и Дюлоне, а также у штаммов *Streptomyces spp.* 19, 47, 66, 205, выращенных на комплексных средах М-1 и R. Наибольшее содержание стерина выявлено в биомассе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) при росте на комплексных средах М-1 и R, кроме того, высокую биосинтетическую активность в отношении синтеза стерина показали штаммы *Streptomyces spp.* 12, 66 при культивировании как на комплексных, так и на синтетических средах [112].



Примечание: $P < 0,05$

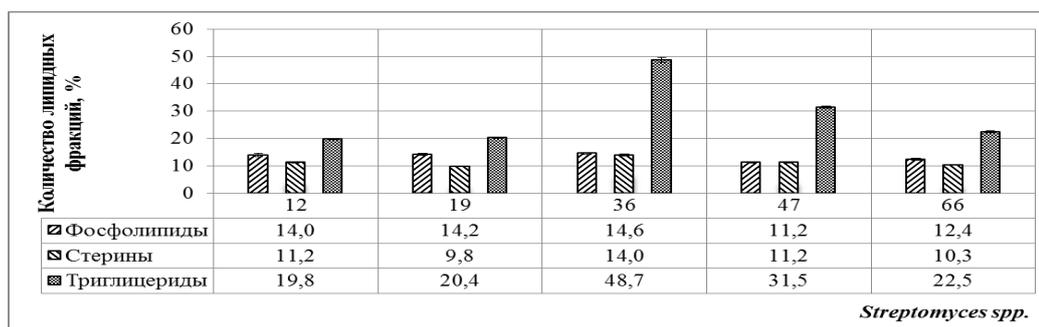
Рис. 3.2. Содержание основных липидных фракций в биомассе штаммов *Streptomyces spp.* при культивировании на среде М-1, % от суммы общих липидов



Примечание: P<0,05

Рис. 3.3. Содержание основных липидных фракций в биомассе штаммов *Streptomyces spp.*

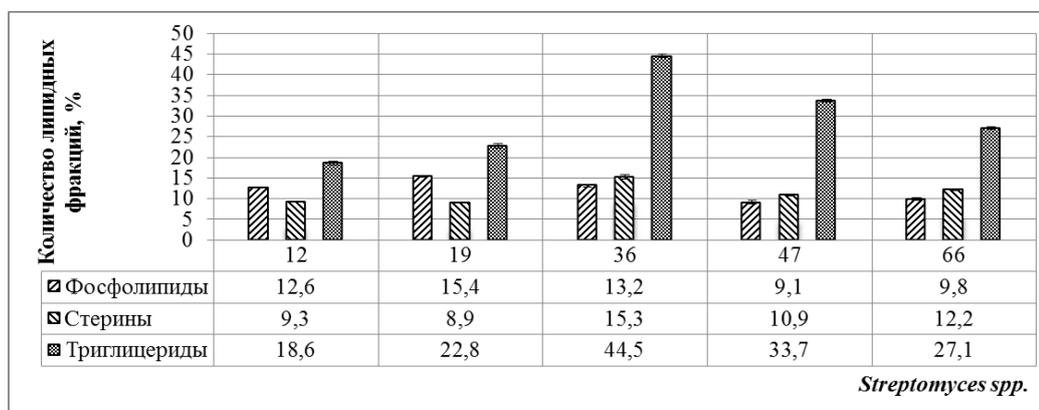
при культивировании на среде R, % от суммы общих липидов



Примечание: P<0,05

Рис. 3.4. Содержание основных липидных фракций в биомассе штаммов *Streptomyces spp.*

при культивировании на среде Чапека, % от суммы общих липидов



Примечание: P<0,05

Рис. 3.5. Содержание основных липидных фракций в биомассе штаммов *Streptomyces spp.*

при культивировании на среде Дюлоне, % от суммы общих липидов

Замечено, что количество основных физиологически активных липидных фракций (ФЛ, СТ) изменяется в зависимости от состава питательной среды. Кроме того, в результате эксперимента были выявлены штаммы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) и *Streptomyces sp.* 66, отличающиеся от других содержанием в биомассе физиологически активных липидных фракций.

Таким образом, в результате проведенного скрининга установлено, что из проверенных 236 штаммов *Streptomyces spp.* наибольшую продуктивность в отношении накопления биомассы (до $19,62 \pm 0,07$ г/л) показали штаммы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19) и *Streptomyces sp.* 66, у этих же штаммов в биомассе замечено наибольшее количество липидов ($12,85 \pm 0,55\%$) и, особенно физиологически активных липидных фракций (ФЛ и СТ).

3.2. Определение таксономического положения штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19)

Ранее из почвенных образцов центральной части Молдовы на среде КАА были выделены 236 штаммов стрептомицетов, предварительно отнесенные к роду *Streptomyces*. Исследования показали, что штаммы стрептомицетов, выделенные из почв центральной части Молдовы, обладают способностью к активному накоплению биомассы и липидов, особенно при культивировании на комплексных средах. У одного из штаммов – штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19), выявлено наиболее оптимальное соотношение продуктивности биомассы и способности к липидобразованию при росте на комплексных средах.

Нами было проведено определение таксономического положения штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19). Исследуемый штамм поддерживали двумя способами: методом периодических пересевов, используя 3 агаризованных среды – среду Чапека, среду Гаузе и овсяный агар, а также в лиофильном виде.

Изучение морфо-культуральных свойств показало, что штамм формирует колонии, в основном, плотные, кожистые, шероховатые, с каплевидным профилем и с хорошо развитым воздушным мицелием. Спораносцы прямые, длинные, примитивные спирали, расположены моноподиально, одиночно, на концах имеют крючкообразный завиток. Оболочка спор гладкая, споры овальные. Эти признаки являются генетически закреплёнными и стабильными для стрептомицетов [54].

При выращивании на агаризованных средах *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19) образует: воздушный мицелий – мелово-белый, белый (при росте на всех средах), зеленовато-серый (среда Чапека), субстратный мицелий колоний штамма имеет желтоватые оттенки при росте на средах Гаузе, ОА, СР-1, на среде Чапека субстратный мицелий имеет мраморно-розовый цвет, а на среде ПГ – кожанобурый, диффузии растворимого пигмента в агар-агар нет, меланоидный пигмент не образует.

Цвет воздушного мицелия типовых штаммов кремовый до розово-сиреневого или оранжево-розового (ОА, среда Гаузе), бело-розовый, жемчужно-розовый (АЧ). Субстратный мицелий желтоватый (ОА, среда Гаузе) до бледно-желто-оранжевого и оранжевого (ОА, АЧ, среда Гаузе) [27].

При рассмотрении колоний, выросших на агаризованной среде Чапека, выявлено, что форма колоний – неправильная, профиль – выпуклый, поверхность – шероховатая, консистенция – кожистая, порошкообразная, без блеска. На поверхности среды наблюдается слабый, невыраженный рост колоний изучаемого штамма трептомицета (Рисунок 3.6 а).

Культивирование штамма на среде ОА показало довольно хороший рост колоний, при этом они были круглой формы с гладкими фестончатыми краями, с мелкозернистой структурой и с шероховатой поверхностью, блеск отсутствовал, консистенция также была кожистой (Рисунок 3.6 б).

Форма колоний, выросших на агаризованной среде Гаузе, круглая с гладким краем и морщинистой поверхностью, а также с однородной структурой, консистенция колоний кожистая, без блеска (Рисунок 3.6 с).

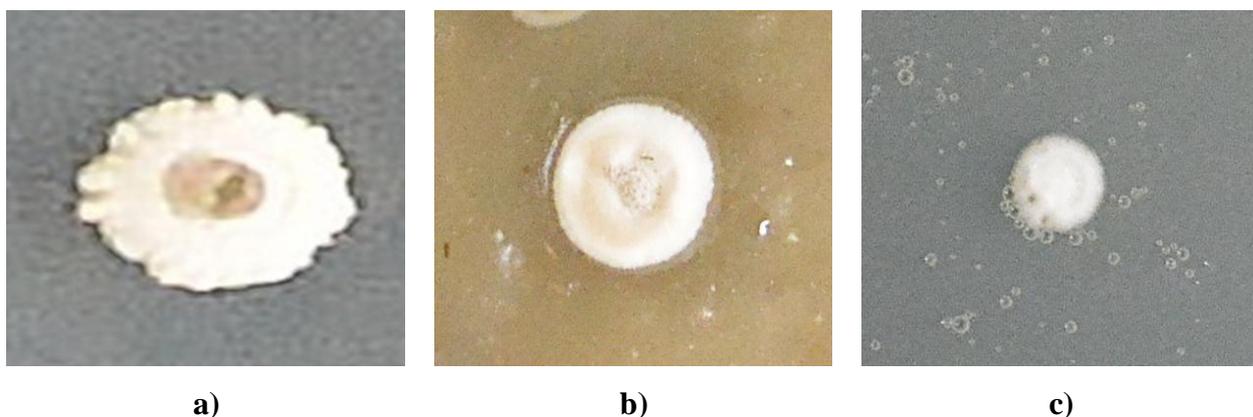


Рис. 3.6. Колония *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (*Streptomyces sp.* 19) при росте на среде Чапека (а), ОА (б) и на среде Гаузе (с)

Были исследованы колонии штамма, выросшие на среде Придхема-Готтлиба. Колонии были круглой формы с валиком по краю, однородной структуры, с шероховатой поверхностью и кожистой консистенцией, без блеска. Был отмечен слабый рост колоний (Рисунок 3.7 а).

Колонии, выросшие на среде СР-1, имели круглую с реснитчатым краем форму, выпуклый профиль и однородную структуру. При этом наблюдалась очень хорошая активность роста колоний (Рисунок 3.7 б) (Приложение 1).

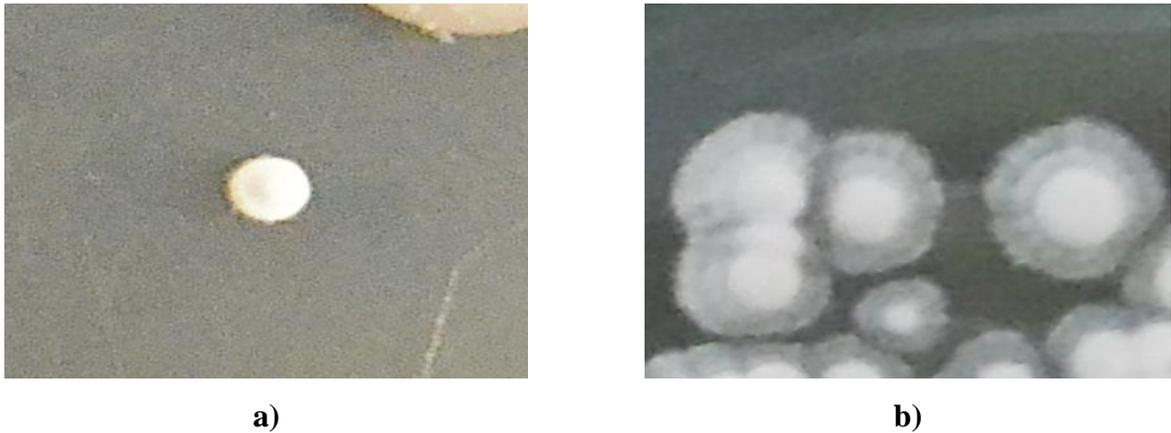


Рис. 3.7. Колония *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) на среде Придхема-Готтлиба (а) и на среде СР-1 (b)

Обычно при расसेве на агаризованные среды природные культуры стрептомицетов расщепляются на клоны, которые отличаются по ряду признаков (морфо-культуральных, физиологических и др.). Изменчивость проявляется в характере роста колоний, которые могут быть разными между собой по форме, размеру, окраске субстратного и воздушного мицелия, степени образования воздушного мицелия и способности окрашивать среду. Естественная изменчивость культур неодинаково выявляется на различных агаризованных средах, поэтому целесообразно изучать вариабельность исходного штамма на нескольких агаризованных средах [42]. Проверка на морфо-культуральную однородность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) на выше упомянутых стандартных агаризованных средах показала, что популяция изучаемого штамма гомогенна.

Изучение физиолого-биохимических свойств *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) показало, что штамм хорошо усваивает глюкозу, арабинозу, фруктозу, плохо – лактозу, мальтозу, раффинозу, слабо растет в присутствии ксилозы, сахарозы. Не ассимилирует рамнозу, маннитол, парафин. Разжижает желатин, коагулирует и пептонизирует молоко, не растет на клетчатке, гидролизует крахмал, не восстанавливает нитраты до аммиака, не образует сероводород.

На основании совокупности биохимических, физиологических и морфо-культуральных признаков (субстратный мицелий колоний штамма имеет желтоватые оттенки при росте на средах Гаузе, ОА, СР-1, на среде Чапека – мраморно-розовый цвет, а на среде ПГ – кожано-бурый, цвет воздушного мицелия, в основном, мелово-белый, спораносцы прямые, длинные, примитивные спирали, на концах имеют крючкообразный завиток, расположены моноподиально, одиночно, оболочка спор гладкая, споры овальные, пигментов не образует), а также согласно литературным данным [27, 54] было установлено таксономическое положение изучаемого нами штамма. Оценку признаков

штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) проводили совместно с сотрудниками Института Микробиологии и Вирусологии им. Заболотного Д.К. НАН Украины. Таксономическое положение изучаемого нами штамма следующее: царство *Bacteria*, тип *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*, порядок *Streptomycetales*, семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид *Streptomyces fradiae* [27].

Культура *Streptomyces fradiae* выделена Waksman и Curtis в 1916 году, относится к международному видовому эталону *Streptomyces fradiae* ISP 5063. Н.А. Красильников, 1970, относит штамм *Streptomyces fradiae* к розовой группе, характерной чертой представителей которой является розовая окраска воздушного мицелия. Колонии с нижней стороны часто имеют желтоватую, желтовато-коричневую и даже желтую окраску или оттенок. Культуры данной группы широко распространены в почвах, обнаруживаясь и в тропиках, и на севере [54].

На синтетических средах (ср. Чапека, СР-1) образует бесцветные, с желтоватым оттенком колонии, воздушный мицелий беловатый. При культивировании на органических средах штамм показывает хороший рост, цвет колоний имеет различные оттенки желтого цвета, воздушный мицелий окрашен в беловатый или серо-розовый цвет. Культуры штамма *Streptomyces fradiae* разжижают желатину, активно свертывают и медленно пептонизируют молоко, гидролизуют крахмал, хорошо ассимилируют глюкозу, галактозу, маннозу, слабо – лактозу, мальтозу [54, с. 333-334].

Исследуемый штамм внесен 27.10.2016 г. в Национальную Коллекцию Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии как *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

3.3. Накопление биомассы, синтез липидов, углеводов и аминокислот штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

В соответствии с задачей исследований: изучение биосинтетических особенностей штамма, нами были проведены опыты по определению выхода биомассы, качественного и количественного состава липидов, углеводов и аминокислот штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

Ранее для определения биосинтетических возможностей штамма, а также для поиска питательной среды, при росте на которой образуется большее количество биомассы, проводили культивирование на четырех жидких средах: М-1, R, Чапека и Дюлоне. Опыты показали, что наибольшее количество биомассы было получено при росте штамма на жидких питательных средах М-1 и R ($14,15 \pm 0,21$ г/л и $13,46 \pm 0,52$ г/л

соответственно) (Таблица 3.1, стр. 59). Это комплексные среды, которые готовят с добавлением кукурузной муки и дрожжей (среда М-1) и крахмала, кукурузной муки и нитрата аммония (среда R). Следовательно, при росте на питательной среде с добавлением органических компонентов продуктивность штамма выросла.

Следующим этапом исследования было определение способности штамма к липидообразованию. Известно, что липиды выполняют ряд функций: транспортная (доставка лекарственных и питательных веществ в составе липосом или выведение ряда соединений из клетки), энергетическая (обеспечение энергетических процессов, происходящих в клетке), регуляция клеточной активности, иммунологическая, восстановительная (восстановление липидного состава мембран), эмульгирующая [14, 49, 56]. Накопление липидов стрептомицетами имеет огромное значение, т.к. это свойство можно использовать для получения физиологически активных липидных фракций в промышленных масштабах. В литературе последних лет XX века и начала XXI века все чаще можно встретить сообщения о разработке новых лечебно-профилактических продуктов, в состав которых в обязательном порядке входят фосфолипиды, обладающие гиполипидемическими, гипохолестеринемическими потенциями, а также свойствами антиоксидантов, радиопротекторов [20, 24]. Имеется обобщенный значительный фактический материал по получению и применению стеринов микробного происхождения, кроме того приводятся данные, указывающие на целесообразность использования стеринов микроорганизмов для химической или биологической трансформации их в витамины группы Д и андростановые гормоны [81].

Опыты показали, что в биомассе штамма, культивированного на жидкой комплексной питательной среде R, содержится $12,85 \pm 0,55\%$ липидов (Таблица 3.2, стр. 60).

Методом тонкослойной хроматографии было установлено, что липиды штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 содержат следующие фракции: фосфолипиды, стерины, свободные жирные кислоты, моно-, ди- и триглицериды, эфиры стеринов и воска, а также одну неидентифицированную фракцию, причем количество каждой из фракций неодинаково и зависит от среды культивирования.

Анализ содержания основных липидных фракций показал, что при культивировании исследуемого штамма на среде Дюлоне количество фосфолипидов и триглицеридов составляет 15,42 и 22,80% соответственно (Рисунок 3.5, стр. 64), но культивирование *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на этой среде показало самую низкую продуктивность в отношении выхода биомассы и общих липидов: 2,26 г/л и 4,91%

соответственно (Таблица 3.1, 3.2). Поэтому для накопления основных липидных фракций более перспективными следует считать комплексные среды М-1 и R. Так, при культивировании изучаемого штамма на среде М-1 выявлено, что количество фосфолипидов и стерина на ней составило 13,78 и 11,27% соответственно (Рисунок 3.2, стр. 61). На среде R содержание фосфолипидов и стерина в липидах биомассы составило 19,34% и 12,14% соответственно (Рисунок 3.3, стр. 62). Кроме того, при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на среде R получена биомасса с содержанием триглицеридов и свободных жирных кислот 18,67 и 12,43% соответственно (Рисунок 3.3, стр. 62, Таблица 3.3, стр. 68). При росте штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на комплексной среде R количество биомассы составило $13,46 \pm 0,52$ г/л, содержание липидов – $12,85 \pm 0,55\%$, поэтому культивирование штамма на среде R является продуктивным для получения биомассы с высоким содержанием физиологически активных липидных фракций в ней.

Данные о количестве основных физиологически активных липидных фракций были представлены ранее (Рисунок 3.2–3.5), в таблице 3.3 показаны результаты исследования количества остальных липидных фракций, синтезируемых штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на 4-х средах.

Таблица. 3.3. Содержание липидных фракций в биомассе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на разных средах, % от суммы общих липидов

Фракция Среда	Неидентифици- рованная фракция	Моно- +диглицериды	Эфиры стеринов	Воски	Свобод- ные ЖК
М-1	$4,73 \pm 0,02$	$5,76 \pm 0,30$	$15,84 \pm 0,27$	$24,70 \pm 0,32$	$8,43 \pm 1,01$
R	$5,30 \pm 0,31$	$6,84 \pm 0,21$	$18,43 \pm 0,52$	$18,85 \pm 0,60$	$12,43 \pm 0,25$
Чапика	$7,70 \pm 0,06$	$21,60 \pm 1,57$	$11,60 \pm 0,34$	$11,51 \pm 0,54$	$16,01 \pm 0,32$
Дюлоне	$9,11 \pm 0,66$	$20,90 \pm 0,70$	$14,30 \pm 0,93$	$10,91 \pm 1,76$	$11,49 \pm 0,78$

Примечание: $P < 0,05$

Для дальнейшего изучения состава биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 было проведено культивирование его на среде R, содержащей в качестве основных источников углерода и азота крахмал, кукурузную муку и нитрат аммония. Данная среда была выбрана нами как основная для получения биомассы, т.к. исследуемый штамм при росте на этой среде показал достаточно высокую продуктивность биомассы, липидов и таких физиологически активных липидных фракций, как фосфолипиды, стерина, триглицериды.

Для полноты характеристики биомассы исследуемого штамма нами был исследован углеводный состав биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11,

культивируемого на среде R, т.к. углеводы обеспечивают энергией процессы жизнедеятельности клетки. Были получены данные об общем количестве углеводной фракции, что составило $21,60 \pm 0,51\%$ от общего количества биомассы.

Далее было проведено изучение аминокислотного состава биомассы, который определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе ААА-339 «Микротехника» (Чехия).

Таблица. 3.4. Содержание аминокислот в биомассе и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при росте на среде R

Аминокислота	Биомасса, мг/г	Культуральная жидкость, мг/л
Цистеиновая кислота	$3,3 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
Аспарат+аспарагин	$15,5 \pm 1,7$	$0,5 \pm 0,1$
Треонин	$12,8 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$
Серин	$7,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
Глутамат+глутамин	$85,0 \pm 3,0$	$1,7 \pm 0,1$
Пролин	$18,1 \pm 2,0$	$27,3 \pm 0,6$
Глицин	$15,1 \pm 0,4$	$3,4 \pm 1,3$
Аланин	$36,0 \pm 1,5$	$1,9 \pm 0,1$
Валин	$12,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
Цистеин	$8,0 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,1$
Метионин	$3,2 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1$
Изолейцин	$7,3 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$
Лейцин	$27,3 \pm 2,2$	$1,6 \pm 0,1$
Тирозин	$4,1 \pm 1,1$	$8,8 \pm 0,2$
Фенилаланин	$8,1 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$
Гамма-аминомасляная кислота	$1,7 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$
Лизин	$10,6 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,2$
Гистидин	$4,3 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$
Аргинин	$10,5 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,1$

Примечание: $P < 0,05$

Как видно из данных, представленных в таблице 3.4, у исследуемого штамма в биомассе содержится 19 аминокислот. Среди заменимых аминокислот наибольшее количество наблюдалось у глутаминовой кислоты – 29% от общего количества, аланина – аминокислоты с иммуностимулирующим действием – 12%, пролина как одного из основных компонентов коллагена – 6%, а также по 5% – у глицина и аспартата, которые также обладают стимулирующими свойствами, аспарат также участвует в синтезе ДНК и РНК. Содержание аргинина и лизина – аминокислот с иммуностимулирующими свойствами – около 8%. Из незаменимых аминокислот в наибольшем количестве был лейцин – около 9% от общей массы аминокислот [16]. Незаменимые аминокислоты

характеризуются тем, что они не могут быть самостоятельно синтезированы в организме животных и человека, поэтому они должны поступать с пищей [31].

В полученной биомассе суммарное содержание аминокислот составило около 300 мг/г (Таблица 3.5). Общее количество заменимых аминокислот (синтезируются макроорганизмом) было равно 65% от общего количества, а незаменимых (лизин, гистидин, метионин, треонин, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин) – около 33%. Группа иммуноактивных аминокислот, которая включает треонин, валин, триптофан, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, серин, аланин, цистин, γ -аминомасляную кислоту, составила около 62% от общего количества [16]. Эти аминокислоты формируют иммуноактивные белки организма, участвуют в образовании специфических антител, ускоряют производство Т-лимфоцитов [31].

Таблица. 3.5. Суммарное содержание аминокислот в биомассе и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на комплексной среде R

Сумма аминокислот	Биомасса, мг/г	Культуральная жидкость, 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

Примечание: P<0,05

Таким образом, проведенные исследования показали, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 содержит в составе аминокислоты, в том числе незаменимые, углеводы, липиды и физиологически активные липидные фракции, что имеет значение при рассмотрении возможности применения данной биомассы в качестве основы биопрепарата.

3.4. Антимикробная активность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

На протяжении многих лет стрептомицеты привлекают к себе пристальное внимание, прежде всего, как потенциальный источник новых антибиотиков, обладающих широким спектром действия. Большинство исследователей свидетельствует о наличии высокой антагонистической активности среди представителей рода *Streptomyces*, входящего в семейство *Actinomycetes*, и показывает эффективность использования их метаболитов в качестве ингибиторов роста фитопатогенов сельскохозяйственных

растений, сеянцев хвойных, овощных культур и пр. [37, 106]. Кроме того, род *Streptomyces* содержит множество видов – продуцентов антибиотиков, производимых фармацевтической промышленностью [106]. В частности, как было изложено выше, штаммы *Streptomyces fradiae* образуют такие антибиотики, как неомицин, фрадицин, подавляющий рост грибов, тилозин, а также фосфомицин и декамицин [41, 148]. Неомицин широко используется в ветеринарной практике, применяется в емкостях для хранения нефтяного топлива, где он предотвращает формирование осадка, и на плантациях каучукового дерева, уменьшая риск возникновения бактериальной инфекции надрезов на деревьях, сделанных для получения латекса [205].

Известно, что штаммы стрептомицетов, выделенные из разных регионов, как правило, обладают рядом отличительных свойств [41, 45, 54]. По Красильникову Н.А., 1970, только один штамм *Streptomyces fradiae* 205 из коллекции выделялся своим антидрожжевым спектром и синтезировал антигрибной антибиотик, эффективный против *Aspergillus niger*. Кроме того, он угнетал рост всех штаммов *Streptomyces fradiae*, но сам не был чувствителен к ним, т.е. характеризовался односторонним антагонизмом [54]. В соответствии с описанием представителей видов стрептомицетов, выполненным Валагуровой Е.В. и др. (2003), типовой штамм *Streptomyces fradiae* являлся антагонистом грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и дрожжей и продуцировал такие антибиотики, как фрадицин, френомицин и др. [27].

Для исследования антагонистической способности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 использовали метод агаровых блоков [41]. Контролем в опыте служили стандартные диски с антибиотиком.

Как видно по данным, представленным в таблице 3.6, штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированный на среде Чапека, вызвал образование зон задержки роста *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* диаметром до $19,0 \pm 2,3$ и $35,0 \pm 3,4$ мм соответственно, а у культуры, выращенной на среде Гаузе, наблюдалось практически полное подавление роста *Candida albicans*, тогда как под влиянием нистатина размер зоны задержки роста составила всего $23,0 \pm 4,1$ мм, а у *Staphylococcus aureus* зона задержки роста составила $20,0 \pm 0,1$ мм в диаметре. Штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированный на среде R, также показал высокую антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*, вызвав образование зон задержки роста диаметром $18,0 \pm 0,2$ и $31,0 \pm 0,1$ мм соответственно. В отношении *Escherichia coli* исследуемый штамм не выявил антимицробной активности.

Таблица. 3.6. Антимикробная активность *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на разных средах, мм

Среда культивирования, антибиотик	Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
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: 1) $P < 0,05$; 2) П.п. – полное подавление.

Также из таблицы видно, что действие метаболитов штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 вызвало некоторое подавление роста *Enterococcus faecalis*, тогда как диски с известными антибактериальными веществами не оказали никакого влияния на культуру, кроме диска с тилозином. На рост *Pseudomonas aeruginosa* метаболиты штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 не оказали практически никакого влияния [107, 109].

С помощью метода диффузии в агар исследование антагонистических свойств штаммов стрептомицетов, выделенных из почв разных районов Египта, где в ходе скрининга один из штаммов был определен как *Streptomyces fradiae*, было обнаружено, что данный штамм, культивированный на агаризованной питательной среде, содержащей крахмал и нитраты, показал наличие антимикробных свойств, максимально выраженных против *Candida albicans* (диаметр зоны задержки роста составил 28,0 мм), а также против *Staphylococcus aureus*, но здесь зона задержки роста имела величину 20,0 мм, исследуемый штамм также проявил активность и против фитопатогенных грибов [184]. Приведенные результаты согласуются с полученными нами данными: метаболиты штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированного на среде Гаузе, содержащей крахмал и нитраты, вызвали подавление роста грамположительных бактерий и дрожжеподобного гриба *Candida albicans* и в меньшей степени проявили антагонистическую активность против грамотрицательных микроорганизмов.

Результаты определения антимикробной активности показывают, что при культивировании на среде Чапека исследуемый штамм вызвал образование зон задержки роста максимально для *Xanthomonas campestris* – возбудителя сосудистого бактериоза капусты – в диаметре до 32,0±0,2 мм, а при росте на других средах – Гаузе и среде R –

также наблюдалось существенное подавление роста этой фитопатогенной бактерии (зоны задержки роста диаметром до $28,0 \pm 0,1$ и $24,5 \pm 3,2$ мм соответственно) (Рисунок 3.8 f).

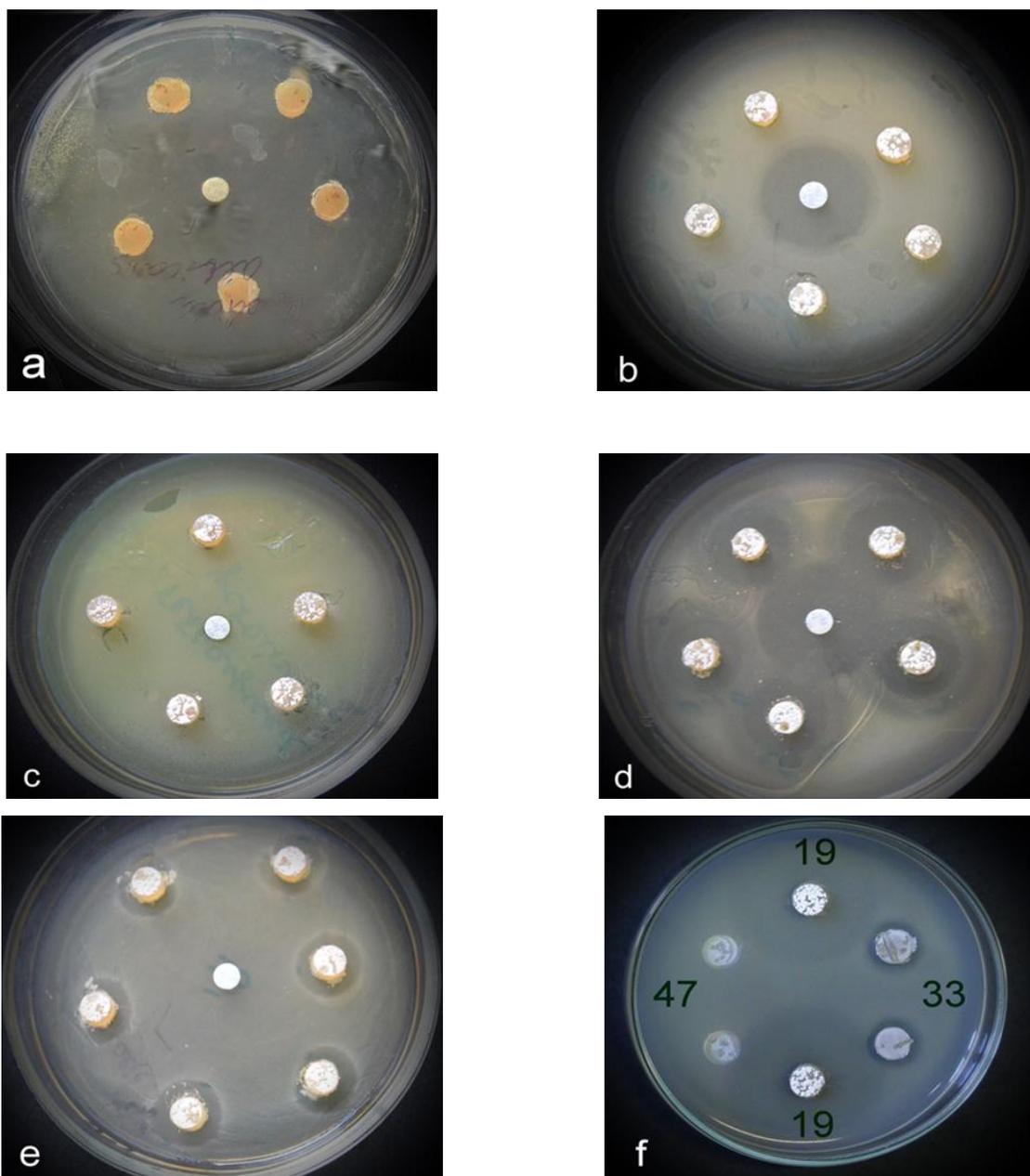


Рис. 3.8. Влияние метаболитов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на рост тест-микроорганизмов: *Candida albicans* (a), *Escherichia coli* (b), *Pseudomonas aeruginosa* (c), *Staphylococcus aureus* (d), *Enterococcus faecalis* (e), *Xanthomonas campestris* (f)

Рост фитопатогенного гриба *Alternaria alternata*, вызывающего т.н. оливковую плесень риса или альтернариоз, задерживался лишь метаболитами штамма, выращенного на среде Чапека, а диаметр зоны отсутствия роста составил только $13,0 \pm 0,1$ мм. Замечено слабо выраженное антимикробное действие и против *Botrytis cinerea*, вызывающего кагатную гниль сахарной свеклы. Для *Fusarium oxysporum* также отметили антимикробное

действие метаболитов штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированного на среде Чапека (диаметр зоны задержки роста до $13,5 \pm 1,5$ мм). Обнаружена антимикробная активность и против фитопатогенного гриба *Fusarium solani*, вызывающего корневую гниль сои. У этой тест-культуры диаметр зоны задержки роста составил около $15,0 \pm 0,2$ мм после культивирования штамма на среде Чапека. Диаметр зоны задержки роста *Clavibacter michiganensis* составил $14,0 \pm 0,2$ мм при росте *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на среде R (Таблица 3.7) [107, 110].

Таблица. 3.7. Антимикробная активность метаболитов штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 против фитопатогенных микроорганизмов

Среда культивирования	Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм							
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>
Среда Чапека	$13,0 \pm 0,1$	$10,0 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,6$	$13,5 \pm 1,5$	$15,0 \pm 0,2$	$32,0 \pm 0,2$	0	$12,0 \pm 0,1$
Среда Гаузе	0	$10,5 \pm 1,5$	$11,0 \pm 0,1$	$10,0 \pm 0,1$	$11,5 \pm 2,0$	$28,0 \pm 0,1$	0	$12,0 \pm 1,1$
Среда R	0	$9,0 \pm 0,1$	$9,5 \pm 1,0$	$10,0 \pm 0,1$	$11,5 \pm 1,1$	$24,5 \pm 3,2$	0	$14,0 \pm 0,2$

Примечание: $P < 0,05$

Проведенные исследования показывают, что выделенный из почв Молдовы штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 обладает антимикробной активностью по отношению к ряду тест-микроорганизмов. К метаболитам штамма оказались чувствительными *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis* и высоко чувствительна *Candida albicans* [84]. Также впервые выявлено, что высокочувствителен к действию метаболитов этого штамма часто встречающийся в Молдове фитопатоген *Xanthomonas campestris* (диаметр зоны задержки роста – $24,5$ – $32,0$ мм), в отличие от приведенных в литературе данных по другим штаммам этого вида [27, 54]. Выявленную способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 можно использовать для поиска средств биологической защиты растений.

3.5. Влияние метаболитов *Arthrospira platensis* на рост и липидный состав биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

Цианобактерии – фототрофные прокариоты, использующие для своей жизнедеятельности энергию света, причем они осуществляют кислородный фотосинтез, то есть синтезируют органическое вещество из углекислого газа и воды, при этом освобождается молекулярный кислород. Это единственные прокариоты, способные к

оксигенному фотосинтезу. Они содержат хлорофилл растительного типа и водорастворимые фикобилиновые пигменты: голубые – фикоцианины и красные – фикоэритрины.

Цианобактерии широко распространены в морях и пресных водоемах, также в почвенном покрове. Кроме того, данные микроорганизмы могут участвовать в симбиозах (лишайники). Весомую часть фитопланктона водоемов составляют водоросли именно данной группы. Они способны образовывать толстые многослойные покровы на субстрате. Отдельные виды обладают токсичностью и являются условно-патогенными для человека. Для некоторых видов характерна редкая комбинация свойств: способность к фотосинтезу и одновременно фиксации азота из атмосферного воздуха [35, 99].

Для цианобактерий характерна выраженная биосинтетическая активность. Они синтезируют следующие вещества: липопептиды – около 40,0% от веса биомассы, аминокислоты – 5,6%, жирные кислоты – 4,2%, макролиды – 4,2%, амиды – до 9,0%. Липопептиды обладают следующими эффектами: цитотоксическим, противоопухолевым, противовирусным, антибиотическим [157]. Цианобактерии способны синтезировать и секретировать широкий спектр БАВ. В ряде случаев из цианобактерий удалось выделить и идентифицировать фитогормоны – ауксины и цитокинины [9].

Среди представителей рода *Arthrospira (Spirulina)* выделяются такие цианобактерии, как *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Spirulina fusiformis*. Они имеют широкий спектр положительного биологического действия на организм человека и лабораторных животных. Установлено, что в биомассе этих цианобактерий содержится до 70,0% белка, представленного всеми незаменимыми аминокислотами, комплекс витаминов, в том числе β-каротин, витамины группы В (В₁, В₂, В₃, В₅ и особенно В₁₂), большое количество макро- и микроэлементов в биодоступной органической форме. Усваиваемость белка спирулины составляет 85–90%. Спирулина содержит функциональные вещества – фикоцианин, полисахариды (около 20,0%), β-глюкан, липиды (до 11%), в том числе полиненасыщенные жирные кислоты, среди которых особенно ценные – линолевая (до 14 000 мг/кг), линоленовая (до 12 000 мг/кг), арахидоновая и эйкозопентаеновая [125]. В лаборатории Фикобиотехнологии Института Микробиологии и Биотехнологии из биомассы стволов водорослей *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst) Geitl. путем экстракции и фракционирования получен препарат BioR, содержащий аминокислоты, олигопептиды и микроэлементы Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Cr и др. Также в данной лаборатории из биомассы *Arthrospira (Spirulina) platensis* извлечен препарат, носящий название «Сульфатированные полисахариды с цинком». Полисахариды являются

длинной цепочкой углеводов, которые, в свою очередь, являются компонентами клеточной стенки, а также экзополисахаридов, с помощью которых осуществляется аутопротекция микроорганизмами [8, 9].

Бактерицидная и бактериостатическая активность по отношению к патогенным и условно патогенным штаммам, а также сопутствующей микрофлоре отмечена у представителей различных таксономических групп (*Chlorophyceae*, *Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Dinophyceae* и *Xanthophyceae*). Антибиотическое действие широкого спектра, свойственное цианобактериям (*Aulosira fertilissima*, *Nostoc muscorum*, *Nostoc punctiforme* Castenholz et Waterbury, *Hapalosiphon* spp., *Cyanobacterium* spp., *Oscillatoria* spp., *Synechocystis* spp., *Synechococcus* spp. и др.) и микроводорослям, характерно для антагонистических взаимоотношений в природных экосистемах и модельных экспериментах. Примеры проявления антибактериальной активности широко освещены в многочисленных работах [33, 99, 157].

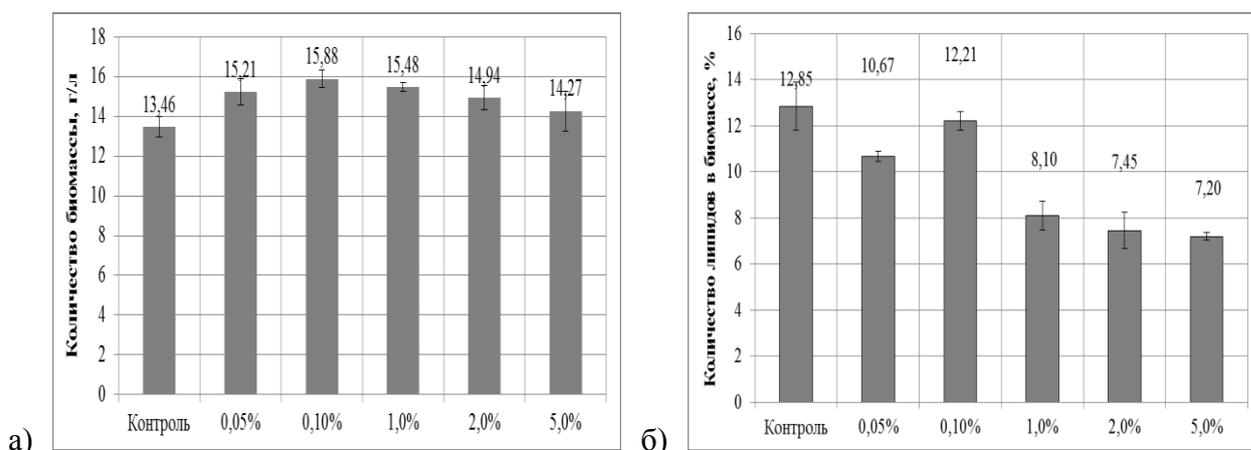
Фотосинтезирующие цианобактерии, распространенные по всему миру, играют важную роль в обогащении почв сельскохозяйственного использования питательными веществами. Они считаются одними из лучших биосистем для повышения плодородия почв путем обогащения их азотом. Благодаря способности к преобразованию азота атмосферы в сложные органические соединения, используя нитрогеназный ферментный комплекс, находящийся в гетероцистах, цианобактерии вносят весомый вклад в азотные ресурсы почвы [101]. Исследования цианобактерий в качестве природных удобрений показали их большой потенциал для увеличения плодородия и восстановления загрязненных почв и воды.

Несмотря на разнообразие и достаточно большое количество рецептов приготовления питательных сред для культивирования актиномицетов, остаются вопросы, связанные с увеличением количества получаемой биомассы и снижением ее стоимости, а также увеличением выхода тех или иных метаболитов продуцентов.

Ранее в Институте Микробиологии и Биотехнологии были проведены опыты, в которых использовали биопрепараты микроводорослей как возможные регуляторы липидообразования у стрептомицетов. Было установлено, что при культивировании штаммов стрептомицетов на комплексных средах с добавлением биопрепаратов в количестве 0,1–1,0 мг/л происходит увеличение выхода биомассы на 4,8–24,7%, а продуктивность липидов возрастает на 12,0–90,7% [24].

В литературе мало данных о влиянии метаболитов микроводорослей на биосинтетическую активность стрептомицетов [4, 24]. В связи с этим нами была

поставлена задача исследовать, как влияет на биосинтетическую активность изучаемого штамма добавление к основной питательной среде препарата BioR.



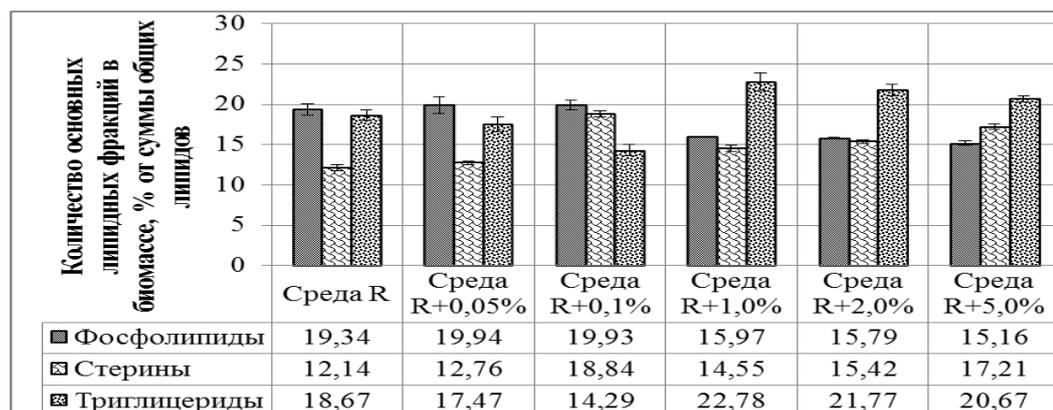
Примечание: $P < 0,05$

Рис. 3.9. Накопление биомассы (а) и липидов (б) штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на комплексной среде R с добавлением BioR, г/л

Как видно на рисунке 3.9 а, при добавлении BioR в концентрации 0,1% наблюдалось увеличение количества биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на 18,2%. В варианте опыта с добавлением препарата в концентрации 0,05% количество биомассы увеличилось по сравнению с контролем на 13,0%. При добавлении BioR в концентрации 1,0, 2,0, 5,0% произошло возрастание количества полученной биомассы на 15,3%, 11,1% и 6,1% соответственно. Следовательно, наибольшую продуктивность биомассы штамма наблюдали при использовании BioR в малой концентрации (0,1%).

Из выращенной на среде R с добавлением BioR биомассы изучаемого стрептомицета проводили экстракцию внутриклеточных липидов. На рисунке 3.9 б видно, что в опытных образцах содержание липидов меньше, чем в контроле: больше всего липидов содержится в биомассе, выросшей с добавлением в среду R BioR в концентрации 0,1%: количество липидов составило 95,6% к контролю. Некоторое уменьшение количества липидов наблюдалось и в варианте с добавлением препарата в концентрации 0,05% – почти на 17,0%. В образцах биомассы штамма, растущего на среде R в присутствии препарата в концентрации 1,0%, 2,0%, 5,0% количество липидов составило 63,4%, 58,9% и 56,8% к контролю соответственно. Полученные результаты показали уменьшение количества липидов в биомассе во всех вариантах опыта. Это происходит, вероятно, потому что BioR по своей химической характеристике является комплексом аминокислот и олигопептидов [8].

Далее было проведено определение фракционного состава липидов у *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на комплексной среде R с препаратом BioR. На рисунке 3.10 показано изменение количества основных липидных фракций (ФЛ, СТ, ТГ) биомассы штамма. Как видно, наибольшее количество фосфолипидов наблюдали в образцах липидов биомассы штамма, выросшего на среде R с добавкой BioR в концентрации 0,05% – 19,9% к общим липидам.



Примечание: P<0,05

Рис. 3.10. Содержание основных липидных фракций в биомассе *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на комплексной среде R с добавлением BioR, % от суммы общих липидов

Наибольшее количество стерина выявлено в пробах общих липидов биомассы, полученной при добавлении препарата в среду в концентрации 0,1%, что составило 18,8% к общим липидам. Количество же триглицеридов было наибольшим в пробах липидов биомассы штамма, растущего на среде R с добавкой BioR в концентрации 1,0%, что составило 22,8% к общим липидам. При подсчете абсолютного содержания основных физиологически активных липидных фракций выявлено увеличение стерина на 55,2% при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на комплексной среде R с добавлением BioR в концентрации 0,1%. Содержание фосфолипидов в этом варианте опыта практически не изменилось (прирост – 3,1%), тогда как в остальных вариантах произошло уменьшение их содержания на 17,4–21,6% [1].

Таким образом, проведенные исследования показали, что для повышения продуктивности биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 наиболее оптимальным является культивирование штамма на комплексной среде R с добавлением BioR в концентрации от 0,1% до 1,0%. Для увеличения содержания в биомассе физиологически активных липидных фракций (фосфолипиды и стерин) культивирование следует проводить на среде R с добавлением BioR в концентрации 0,1%.

По данным Codreanu S., 1995, для стимуляции роста пропионовокислых бактерий и синтеза ими цианкобаламина и порфиринов в среду, содержащую кукурузный экстракт, добавлялись биопрепараты из спирулины и ностока. Они по-разному стимулировали порфириногенез. Наилучшие результаты (203,9–245,5% к контролю) были получены под влиянием препарата из *Nostoc linckia*. При сравнении действия биопрепаратов из зеленой водоросли *Dunaliella salina* и красной водоросли были получены следующие результаты: синтез цианкобаламина стимулировали метаболиты красной водоросли (118,3–120,2%), а препарат из зеленой водоросли – образование порфирина (113,3–123,7%). Однако стимуляция синтеза этих биологически ценных соединений происходила на фоне снижения образования биомассы (74,5–96,5% к контролю) [4].

Учитывая, что изменение состава питательной среды ведет к изменению количества тех или иных составляющих биомассы культивируемых организмов, нами были проведены опыты по исследованию влияния на биосинтетическую активность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 препарата СПС_{Zn}, добавленного к основной питательной среде R в разной концентрации.

Опыты показали, что добавление в комплексную питательную среду R препарата СПС_{Zn} не выявило значительного увеличения количества биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (на 8,5% и 12,1% по отношению к контролю в вариантах с добавлением СПС_{Zn} в концентрации 5,0% и 10,0% соответственно) (Таблица 3.8). Штамм оказался более продуктивным в отношении накопления биомассы при использовании этого препарата в малой концентрации.

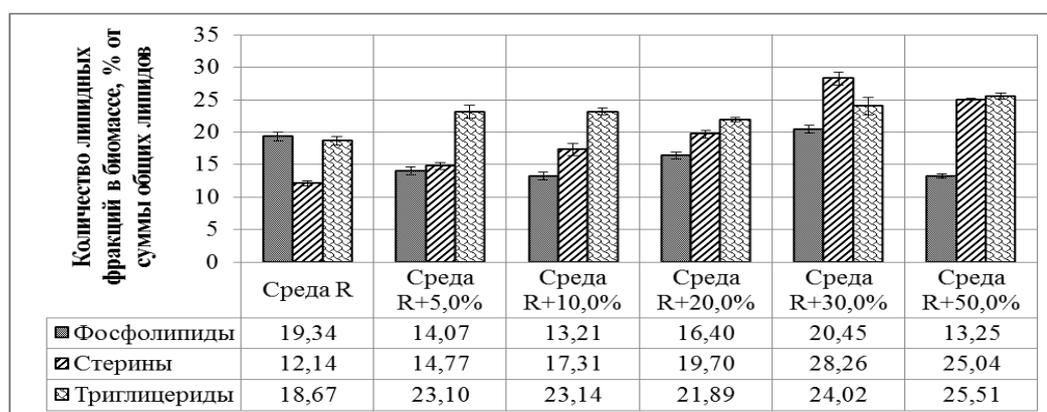
Таблица. 3.8. Накопление биомассы и липидообразование штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на комплексной среде R с добавлением СПС_{Zn}

Среда культивирования	Количество биомассы		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 + 5,0% СПС _{Zn}	14,54±0,23	108,48±3,27	10,51±2,63	81,76±23,76
Среда R + 10,0% СПС _{Zn}	15,08±0,27	112,12±5,25	10,18±0,65	79,21±4,82
Среда R + 20,0% СПС _{Zn}	13,73±0,41	102,02±4,93	10,52±1,51	81,83±14,51
Среда R + 30,0% СПС _{Zn}	12,38±0,22	91,76±1,54	12,63±2,48	98,31±23,25
Среда R + 50,0% СПС _{Zn}	11,84±0,48	88,21±12,89	10,12±1,93	78,76±17,38

Примечание: P<0,05

Кроме того, результаты проведенных исследований показали, что увеличения количества липидов в биомассе штамма не наблюдалось ни в одном варианте опыта с добавлением СПС_{Zn} к комплексной среде R. Во всех случаях было замечено снижение содержания липидов в биомассе на 1,7–21,2% по отношению к контролю (Таблица 3.8).

Определение фракционного состава липидов биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивируемого на комплексной среде R с добавлением СПС_{Zn}, выявило, что происходит увеличение количества фосфолипидной фракции почти на 6,0% по сравнению с контролем при культивировании штамма на комплексной среде R с добавлением СПС_{Zn} в концентрации 30,0%. Возрастание содержания стерина относительно контроля происходило при росте исследуемого штамма во всех вариантах опыта по изменению комплексной среды R путем добавления СПС_{Zn}, особенно в биомассе, полученной при внесении препарата в среду культивирования в концентрации 30,0 и 50,0%: выход стерина увеличился на 132,8 и 106,2% соответственно. В целом, препарат СПС_{Zn} оказал положительное влияние на процесс стеринаобразования. Кроме того, учитывая, что это вещество в концентрации 5,0% и 10,0% увеличило выход биомассы исследуемого штамма, продуктивность стерина значительно возросла, что имеет большое значение при рассмотрении данной биомассы как источника физиологически активных липидных фракций (стерина). Количество триглицеридов было самым большим в липидах биомассы штамма, культивированного на среде R с добавкой СПС_{Zn} в концентрации 50,0%, их увеличение составило 36,7% к контролю. В остальных вариантах увеличение количества триглицеридов составило от 17,3 до 28,6% по отношению к контролю (Рисунок 3.11).



Примечание: P<0,05

Рис. 3.11. Содержание основных липидных фракций в биомассе *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на комплексной среде R с добавлением СПС_{Zn}, % от суммы общих липидов

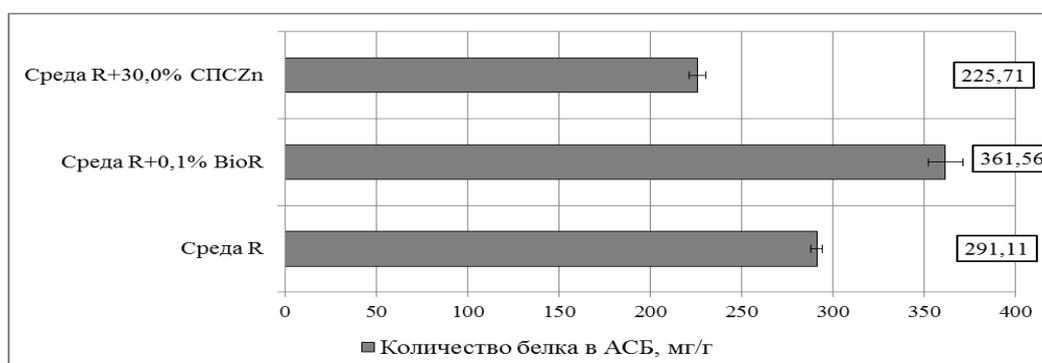
Таким образом, добавление к комплексной среде R препарата СПС_{Zn} не оказало существенного влияния на образование биомассы штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, но большое значение имеет увеличение содержания такой физиологически важной фракции, как стерина.

3.6. Синтез аминокислот и углеводов штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на среде R с препаратами BioR и СПС_{Zn}

Ранее нашими опытами была показана способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 к накоплению в биомассе 19 аминокислот, в том числе и 8 незаменимых, в разном количестве. Важность этих аминокислот трудно переоценить. Так, треонин участвует в синтезе иммуноглобулинов, валин поддерживает в организме уровень серотонина, фенилаланин принимает участие в синтезе меланина и инсулина, лизин способствует накоплению кальция в организме, гистидин является исходным сырьем для синтеза гистамина, а также в больших количествах содержится в гемоглобине, метионин выступает донором метильных групп для синтеза других БАВ. Условно заменимая аминокислота аргинин своим наличием стабилизирует вторичную и третичную структуры белка. Серин входит в состав активного центра некоторых ферментов, сложных липидов, цистеин является серосодержащей аминокислотой, участвует в синтезе коэнзима А [31].

Нами была поставлена задача исследовать содержание общего белка и его мономеров в биомассе, полученной при росте на измененной питательной среде R. Были отобраны образцы биомассы, заметно отличающиеся по липидному составу, полученные при росте штамма на основной питательной среде R с добавлением препарата BioR в концентрации 0,1% – образец № 1, а также СПС_{Zn} в концентрации 30,0% – образец № 2, что имеет значение при получении биомассы со сбалансированным качественным составом. Аминокислотный состав полученной биомассы определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе ААА-339 М «Microtehn» (Чехия).

Добавление препарата BioR в основную питательную среду оказало положительное влияние на синтез белка штаммом: увеличение количества протеина составило 24,2% по сравнению с контролем (Рисунок 3.12).



Примечание: P<0,05

Рис. 3.12. Содержание протеина в биомассе *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при культивировании на комплексной среде R с добавками

Добавление в питательную среду R СПС_{Zn} вызвало уменьшение количества белка в биомассе на 22,5% относительно контроля, что, возможно, связано с тем, что данный препарат является комплексом полисахаридов (Рисунок 3.12).

Увеличение количества отдельных аминокислот при оптимизации среды препаратами BioR и СПС_{Zn} весьма выражено. Например, при добавлении в питательную среду BioR количество треонина выросло на 109,3%, серина – на 112,1%, валина – на 102,1%, фенилаланина – на 114,5%, по сравнению с контролем. Увеличение количества таких аминокислот, как цистеин, лейцин, изолейцин, лизин, гистидин, менее выражено. Так, например, количество цистеина увеличилось на 78,9%, лейцина – на 59,6%, изолейцина – на 61,5%, лизина – на 89,5%, гистидина – почти на 94,0% (Таблица 3.9).

Таблица. 3.9. Содержание аминокислот при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11 на среде R с добавками

Аминокислота	Среда R	Среда R + 0,1% BioR		Среда R + 30,0% СПС _{Zn}	
	Кол-во, мг/г	Кол-во, мг/г	% к К	Кол-во, мг/г	% к К
Цистеиновая кислота	3,32±0,03	3,94±1,13	118,85±34,04	2,41±0,80	72,59±24,26
Аспарагин	15,49±1,72	33,65±0,90	217,21±5,82	14,87±0,82	95,99±5,32
Треонин	12,85±0,25	26,88±0,86	209,26±6,69	11,21±0,35	87,26±2,71
Серин	7,56±0,14	16,04±0,61	212,09±7,89	6,59±0,53	87,10±7,06
Глутаминовая кислота	84,96±3,02	62,40±2,62	73,45±3,09	45,07±1,36	53,04±1,61
Пролин	18,11±2,03	13,37±0,42	73,82±2,33	10,17±0,46	56,14±2,54
Глицин	15,10±0,36	14,24±0,12	94,34±0,79	12,12±0,53	80,25±3,49
Аланин	35,99±1,49	23,62±2,39	65,64±6,64	22,10±0,29	61,41±0,80
Валин	12,82±0,13	25,91±1,17	202,07±9,11	15,77±0,47	123,01±3,65
Цистеин	7,97±0,35	14,26±0,96	178,86±12,02	7,87±0,94	98,68±11,77
Метионин	3,24±0,33	4,40±0,66	135,74±20,33	5,95±1,69	183,77±52,03
Изолейцин	7,25±0,31	11,72±0,32	161,51±4,46	8,87±0,58	122,25±8,00
Лейцин	27,26±2,23	43,51±0,93	159,61±3,41	23,91±0,76	87,68±2,79
Тирозин	4,08±1,14	5,46±0,21	133,75±5,02	2,86±0,38	70,02±9,33
Фенилаланин	8,06±0,16	17,29±1,55	214,49±19,26	8,61±1,24	106,81±15,44
γ-аминомасляная кислота	1,71±0,11	2,04±0,60	119,13±34,92	1,88±1,28	109,83±74,90
Лизин	10,56±0,97	20,02±0,78	189,46±7,34	9,18±1,74	86,89±16,43
Гистидин	4,32±0,2	8,37±0,95	193,86±22,10	4,08±1,04	94,37±24,02
Аргинин	10,46±0,6	14,46±0,28	138,20±2,66	12,23±0,94	116,87±8,99

Примечание: P<0,05

При добавлении СПС_{Zn} в питательную среду наблюдалось увеличение такой аминокислоты, как метионин – почти на 84,0%. Следует отметить, что все аминокислоты, количество которых резко возросло, кроме серина и цистеина, относятся к незаменимым.

Количество последней условно заменимой аминокислоты – аргинина – увеличилось всего на 38,2%.

Анализ суммарного содержания аминокислот в биомассе *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при добавлении в питательную среду BioR показал увеличение выхода практически всех групп, кроме заменимых аминокислот. При добавлении в основную питательную среду СПС_{Zn} наблюдалась обратная тенденция – уменьшение количества практически всех групп аминокислот (Таблица 3.10) [108].

Таблица. 3.10. Влияние добавок к основной питательной среде на суммарное содержание аминокислот в биомассе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

Сумма аминокислот	Среда R	Среда R + 0,1% BioR		Среда R + 30,0% СПС _{Zn}	
	Кол-во, мг/г	Кол-во, мг/г	% к К	Кол-во, мг/г	% к К
Σ аминокислот	291,1±3,1	361,6±9,3	124,2±3,2	225,7±4,6	77,5±1,6
Σ заменимых	189,3±0,8	183,1±29,4	96,7±15,5	121,6±9,2	64,3±4,9
Σ незаменимых	96,8±0,2	172,5±10,7	178,2±11,0	99,8±3,4	103,1±3,5
Σ иммуноактивных	179,4±0,7	204,8±6,7	114,2±3,7	125,4±1,4	69,9±0,8
Σ гликогенных	99,8±1,8	140,4±8,1	140,6±8,1	82,7±2,5	82,8±2,6
Σ кетогенных	57,2±0,2	98,0±4,4	171,3±7,7	53,4±1,7	93,4±3,0
Σ протеиногенных	286,1±1,9	355,6±3,6	124,3±1,2	221,4±1,5	77,4±0,5
Σ серосодержащих	14,5±1,2	22,6±1,8	155,5±12,1	16,2±0,4	111,7±2,4

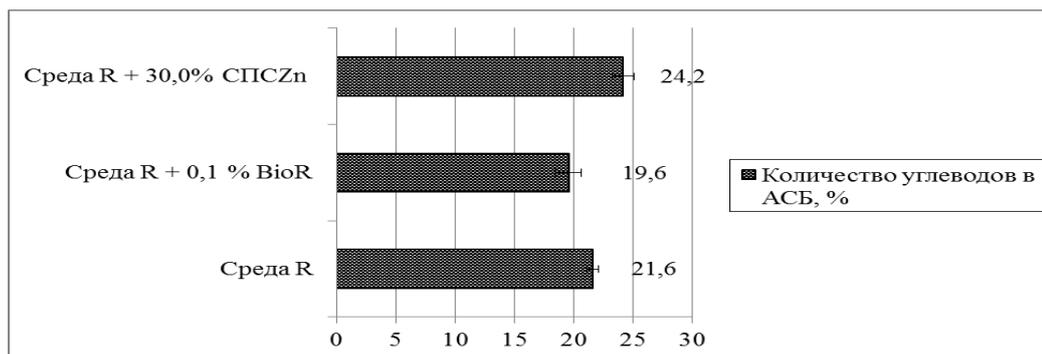
Примечание: P<0,05

Как видно, добавление препарата BioR в концентрации 0,1% привело к увеличению выхода аминокислот на 24,2%. Количество отдельных аминокислот (аспарагин, серин, валин, треонин и фенилаланин) увеличилось более чем вдвое. Добавление другого препарата (СПС_{Zn}) особенно повлияло на биосинтез метионина, увеличив его выход на 83,8%. Тенденция значительного увеличения в количестве, в основном, просматривалась для незаменимых аминокислот. Это говорит о возможности получения этих аминокислот в гораздо большем количестве. Принимая во внимание использование биомассы как основы биопрепаратов, более оптимально получение биомассы при культивировании штамма на среде с добавлением BioR в концентрации 0,1%, т.к. это способствует значительному увеличению ряда важных для макроорганизма аминокислот (Таблица 3.9, 3.10).

Определение количества углеводов в биомассе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, выращенного на комплексной среде R с препаратами из *Arthrospira platensis*, проводили, используя метод с антроновым реактивом [62, 133]. Были выбраны образцы биомассы, которые получены путем культивирования на основной питательной среде R с

добавлением препарата BioR в концентрации 0,1% – образец №1 и СПС_{Zn} в концентрации 30,0% – образец № 2.

Анализ полученных данных показал, что в образце № 1, полученном при культивировании на среде с добавлением BioR, наблюдается уменьшение содержания гексозной фракции по сравнению с контролем на 9,3%, а в образце № 2, который культивировали с добавлением СПС_{Zn} в комплексную среду R, увеличение выхода углеводной фракции составило 12,0% (Рисунок 3.13).



Примечание: P<0,05

Рис. 3.13. Содержание гексозной фракции в биомассе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, выращенного на комплексной среде R с BioR и СПС_{Zn}

Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать применение препаратов из цианобактерий для управления биосинтетической активностью штаммов-продуцентов рода *Streptomyces*, особенно в отношении некоторых синтезируемых ими биологически важных веществ. В частности, добавление препарата BioR к основной питательной среде привело к повышению продуктивности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в отношении накопления биомассы и физиологически активных фракций (ФЛ и СТ), кроме того, в биомассе увеличилось содержание белка. Препарат СПС_{Zn}, добавленный к основной питательной среде, вызвал стимулирование процесса стеринаобразования в значительной степени.

3.7. Выводы по главе 3

Анализ результатов исследований, направленных на изучение факторов, влияющих на рост культуры, образование биомассы, липидов, аминокислот и антимикробные свойства штамма актиномицетов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, позволил сделать следующие выводы:

1. Наибольшее количество биомассы и общих липидов, а также основных физиологически важных фракций (фосфолипиды и стерины), при культивировании на

комплексных средах М-1 и R обнаружено у штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) и *Streptomyces sp.* 66.

2. Изучаемый штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (*Streptomyces sp.* 19) отличается повышенной способностью образовывать биомассу на разных средах (до 14,15 г/л), качественным и количественным составом липидов (фосфолипиды – до 19,34% от суммы липидов, стерина – до 12,14% от суммы липидов).

3. Культивирование штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на комплексной среде R позволяет получить биомассу, отличающуюся по количеству в ней липидов (до 12,85% АСБ), основных физиологически активных липидных фракций (фосфолипиды – до 19,34% от суммы липидов, стерина – до 12,14% от суммы липидов, триглицериды – 18,67% от суммы липидов), по содержанию и составу аминокислот (до 300,0 мг/г).

4. Установлена высокая антимикробная активность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 по отношению к условно-патогенным микроорганизмам *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, а также к фитопатогенному микроорганизму *Xanthomonas campestris*.

5. Проверка на морфо-культуральную однородность изучаемого штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на стандартных агаризованных средах показала, что популяция изучаемого штамма гомогенна.

6. Оптимизация комплексной питательной среды R добавлением 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), стерина (до 18,84% от суммы липидов), белков (361,56 мг/г) и аминокислот как иммуноактивных (204,80 мг/г), так и незаменимых (172,54 мг/г).

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

В настоящее время в животноводстве находят широкое применение кормовые препараты, получаемые путем микробиологического синтеза. В состав этих препаратов входят витамины, аминокислоты, ферменты, липидные фракции, макро- и микроэлементы. Они могут применяться как лекарственные средства или пищевые добавки, т.к. обладают антиоксидантными, антибактериальными, антистрессовыми, противовоспалительными свойствами. В целом, эти вещества положительно влияют на процессы метаболизма в организме животных, что особенно важно для молодняка, а также ослабленных животных [55, 98].

Стрептомицеты характеризуются высокой биосинтетической активностью. В процессе направленного синтеза веществ с антибактериальной активностью стрептомицетами образуется большое количество других метаболитов, которые весьма многообразны по химической структуре, отличаются высокой биологической активностью и способностью к коррекции ряда нарушенных физиологических функций. Все эти свойства были положены в основу разработки кормовых препаратов, получаемых путем микробиологического синтеза, повышающих эффективность использования кормов и стимулирующих рост сельскохозяйственных животных и домашней птицы. Из литературных данных известно, что добавление в рацион таких препаратов, как кормогризин, витаминин, биовит и пр., которые являются высушенной мицелиальной массой стрептомицета-продуцента или биошротами биотехнологического производства, положительно влияет на рост, привесы, продуктивность сельскохозяйственных животных, что является целесообразным для современного сельского хозяйства [72, 83].

В современной науке идет постоянный поиск новых микроорганизмов, синтезирующих БАВ различного спектра действия, в том числе и для создания эффективных комбинированных препаратов для применения их в различных областях. Для этого необходимо иметь данные об их составе, способе получения, промежуточных продуктах, образующихся в результате метаболизма препаратов, механизме действия на физиологические функции организмов, эффекте, полученном при их применении [7, 16, 55].

Кроме того, в животноводстве остро стоит проблема стресса. Ряд авторов отмечают, что наиболее важными факторами, вызывающими формирование стресс-реакции у сельскохозяйственных животных, являются разнообразные технологические

издержки: формирование групп, транспортировка, взвешивание, взятие крови, нарушение условий кормления и содержания [53, 74]. Стресс-реакция у сельскохозяйственных животных проявляется следующими симптомами: снижение или потеря аппетита, беспокойство, повышенная возбудимость, мышечная дрожь, увеличение частоты дыхания и сердечной деятельности, нарастание температуры тела. Вышеперечисленные факторы приводят в итоге к снижению продуктивности и качества продукции, увеличению конверсии корма, повышению заболеваемости и отходов [74]. По данным [34, 100] технологические стрессы ведут к уменьшению продуктивности мясной продукции на всех этапах её производства до 20-30%. Одним из методов преодоления негативных последствий воздействия стресс-факторов является применение веществ с антиоксидантной активностью, т.к. в условиях стресс-реакции чрезмерно активируются процессы перекисного окисления, при этом в большом количестве образуются свободные радикалы – активированные молекулы кислорода, способные повреждать все типы биологических молекул, включая липиды, белки и нуклеиновые кислоты [66, 87]. Известно, что стрептомицеты являются продуцентами веществ с антиоксидантной активностью [117, 191, 206].

4.1. Токсикологические свойства биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

На основании данных проведенных нами исследований установлено, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 содержит белковую, липидную и углеводную фракции (Таблица 4.1), а также вещества с антимикробными свойствами и другие физиологически важные соединения.

Таблица 4.1. Состав биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в зависимости от условий культивирования

Компоненты биомассы	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

Нами была поставлена задача исследовать влияние биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, полученной при разных условиях культивирования, на рост и общее развитие организма теплокровных животных (крыс), их репродуктивные показатели, нейрофизиологические особенности оборонительного поведения, на состав микрофлоры кишечника и пищеварительные функции в обычных физиологических условиях и, в том числе, при действии стрессовых факторов.

Прежде чем проводить исследование влияния биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, определяли их токсические свойства. Оценку острой токсичности культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 производили на 72 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar* путем однократного внутрижелудочного введения культуральной жидкости в разных дозах. На каждую дозу использовали по 9 крыс. Результаты эксперимента по оценке острой токсичности культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 для опытных животных в дозах, предельно допустимых по объему для внутрижелудочного введения (для белых крыс в объеме от 1,0 до 8,0 мл/кг массы тела), показали отсутствие токсического действия на организм животных, т.к. в ходе опыта не наблюдалось гибели и острой интоксикации животных, их общее состояние и поведение не изменились, что не позволило нам установить средне смертельную дозу (LD50) и дозу, вызывающую появление клинической картины токсикоза. Далее производили однократное введение внутрижелудочно разведенной водой сухой биомассы штамма в дозе от 50 до 400 мг/кг массы тела с интервалом в 50 мг/кг. В течение эксперимента также не наблюдалось смертельных исходов среди опытных животных, не было и особых изменений в их внешнем виде и поведении.

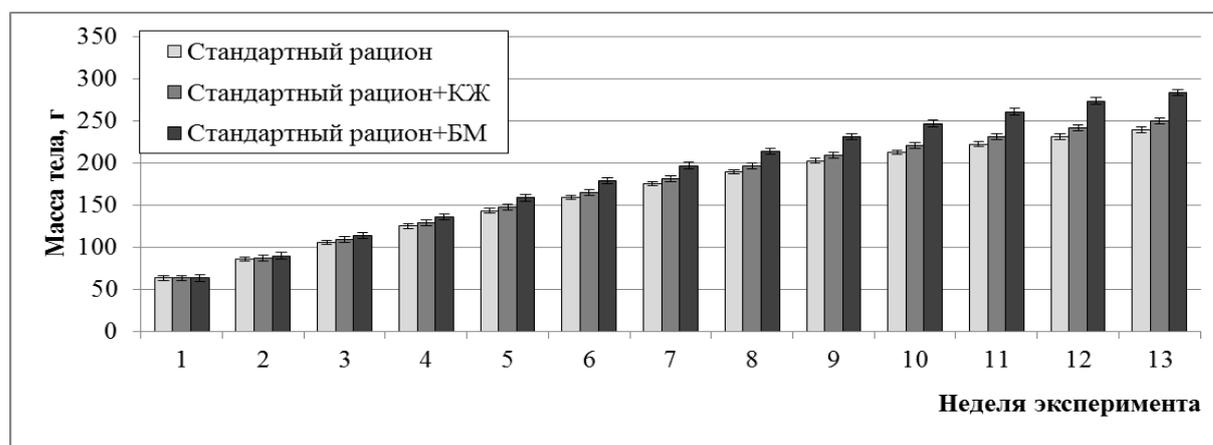
Субхроническую токсичность биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 изучали на 48 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar*. Изучение субхронической токсичности биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на лабораторных животных путем ее добавления к основному рациону в трехкратной терапевтической дозе не оказало отрицательного влияния на их общее состояние [60]. Наблюдение не выявило каких-либо изменений в поведении опытных животных в сравнении с контрольными. Гибели животных на протяжении всего срока эксперимента отмечено не было. Также не было отмечено достоверных изменений массы тела белых крыс по сравнению с контрольными животными. При патоморфологическом исследовании органов экспериментальных животных отклонений и каких-либо особенностей в строении выявлено не было. Коэффициенты массы внутренних органов

подопытных крыс существенно не отличались от показателей контрольных животных. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсического влияния биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на организм и функциональные возможности животных [17]. Данное утверждение позволило нам произвести дальнейшие исследования влияния биомассы и культуральной жидкости на параметры жизнедеятельности животных.

4.2. Изменение массы тела лабораторных животных под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

Исследование влияния биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 проводили на 48 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar*, взятых в 4-недельном возрасте и содержащихся в условиях вивария. Для проведения эксперимента животные были разбиты на 3 группы по 16 крыс в каждой группе: контрольная и 2 опытные.

Полученные результаты, представленные на рисунке 4.1, показали, что в обычных физиологических условиях добавление к основному рациону биомассы исследуемого штамма привело к увеличению массы тела опытных животных: в течение последнего периода опыта (9–12 неделя) экспериментальные животные весили на 23–26% больше по сравнению с контрольными [17].



Примечание: $P < 0,05$

Рис. 4.1. Динамика массы тела белых крыс при добавлении в стандартный рацион биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в обычных физиологических условиях

Масса животных, получавших в качестве добавки культуральную жидкость, практически не отличалась от массы тела контрольных. Можно предположить, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 более эффективно действует в

отношении ростовых показателей организма животных. Поскольку в проведенных опытах была выявлена эффективность биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11 в отличие от культуральной жидкости, в дальнейших экспериментах было решено исследовать влияние на организм и функциональные возможности животных только биомассы.

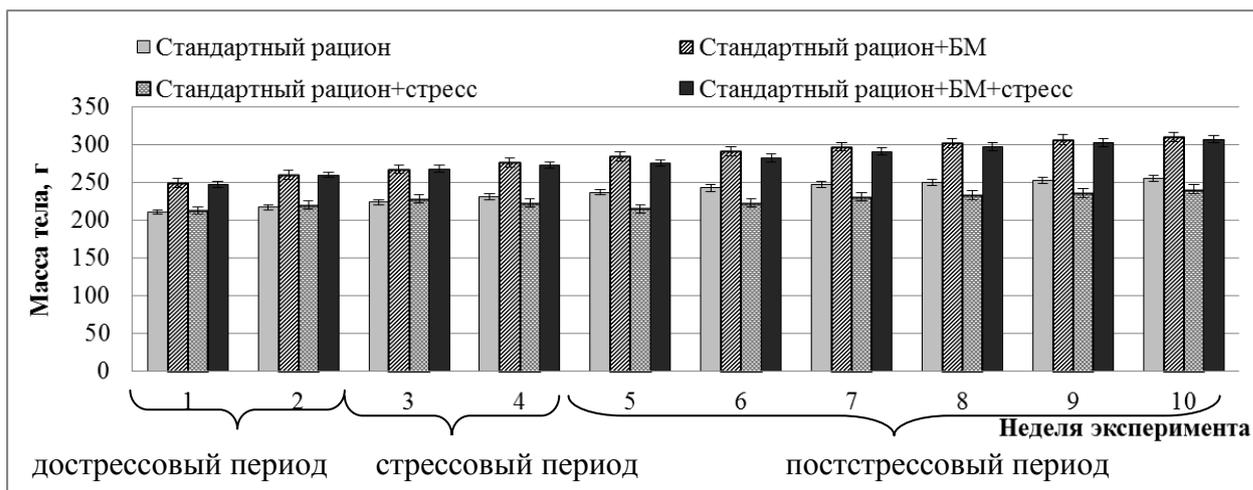
Далее были проведены опыты, направленные на изучение влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11 на различные показатели организма в условиях хронического стресса. Были смоделированы тепловой и иммобилизационный варианты действия стресс-факторов.

Исследование влияния высокой температуры путем моделирования теплового стресса проводили на 48 самцах белых крыс линии *Wistar*, взятых в 4-недельном возрасте и содержащихся в условиях вивария. Для проведения эксперимента животные были разбиты на 2 опытные группы, каждая из которых включала 2 подгруппы по 12 крыс в каждой:

№ 1 – стандартный рацион питания (контроль 1)	}	опытная группа №1
№ 2 – стандартный рацион питания+БМ		
№ 3 – стандартный рацион питания (контроль 2)	}	опытная группа №2
№ 4 – стандартный рацион питания+БМ		

Экспериментальные животные групп № 1 и № 2 не подвергались тепловому стрессу, в течение всего эксперимента они находились в помещении с системой кондиционирования (температура воздуха в помещении составляла +22+24°C). Животные групп №3 и №4 подвергались действию повышенной температуры (+34+36°C) в течение 2-х часов ежедневно. Помимо этого, опытные крысы (группы №2 и №4) получали в качестве добавки к основному рациону высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11 предварительно в течение 3-х месяцев, а затем на протяжении эксперимента и восстановительного периода.

Из представленных на рисунке 4.2 данных видно, что у животных, находившихся в обычных условиях и получавших в качестве добавки к основному рациону высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11 (группа №2), привесы были заметно выше, чем у животных, получавших стандартный рацион питания (группа №1). Животные группы №3, получавшие стандартный рацион питания и подвергавшиеся воздействию теплового стресса, теряли в весе в течение действия чрезвычайного фактора, тогда как у крыс группы №4, в рацион которых входила биомасса исследуемого штамма, наблюдалось повышение массы тела, в том числе и в стрессовый период.



Примечание: $P < 0,05$

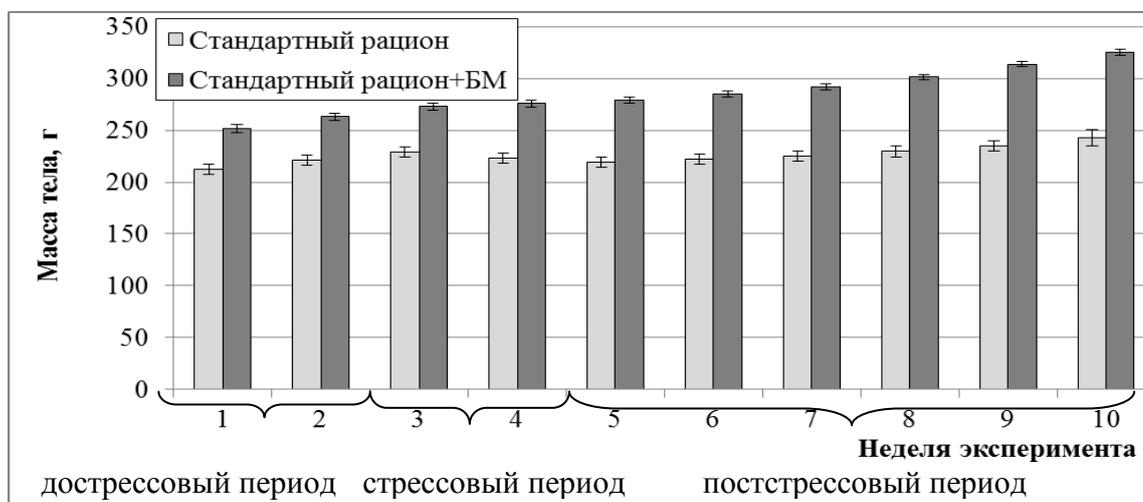
Рис. 4.2. Динамика массы тела белых крыс при добавлении в стандартный рацион биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в условиях теплового стресса

После применения экстремального фактора в течение 14 дней у животных был восстановительный период, в течение которого они продолжали получать биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в качестве пищевой добавки, находились уже в помещении с системой кондиционирования при температуре $+22+24^{\circ}\text{C}$. При этом наблюдалось увеличение массы тела у животных группы №3, получавших стандартный рацион питания, но в меньшей степени, чем у крыс группы №4, употреблявших биомассу вместе с основным рационом [18]. Существенная разница в приросте массы тела животных разных групп, подвергшихся воздействию высокой температуры, выявлена на 3–4 неделе постстрессового периода, что говорит о возможном отдаленном адаптогенном действии веществ биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (Рисунок 4.2).

Следующим этапом исследования было изучение влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при моделировании у опытных животных иммобилизационного стресса. Для проведения опыта были отобраны 24 самца белых крыс линии *Wistar*, взятых в 4-недельном возрасте и содержащихся в условиях вивария. Животные были разделены на опытную и контрольную группы. Животные обеих групп подвергались иммобилизации в течение 2-х недель, далее следовал восстановительный период, в течение которого крысы опытной группы к основному рациону питания получали биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Анализ данных показал, что животные со стандартным рационом питания, подвергавшиеся иммобилизации, потеряли в весе, а у крыс, получавших биомассу, наблюдалось повышение массы тела в течение периода иммобилизации [18]. В течение восстановительного периода крысы опытной группы продолжали получать биомассу

штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. При этом увеличение массы тела наблюдалось у животных обеих групп, но у крыс с обычным рационом в меньшей степени (Рисунок 4.3).



Примечание: $P < 0,05$

Рис. 4.3. Динамика массы тела опытных животных при добавлении в стандартный рацион биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при иммобилизационном стрессе

Лучшую переносимость действия стрессорных факторов у животных, потреблявших биомассу, можно связать с наличием в ней достаточного количества таких физиологически активных фракций, как незаменимые, иммуноактивные аминокислоты, которые оказывают адаптогенный эффект, а также серосодержащие аминокислоты и фосфолипиды, обладающие антиоксидантными свойствами [24, 31].

Таким образом, проведенные исследования показали, что добавление к основному рациону высушенной биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 способствует увеличению прироста массы тела как в физиологических условиях, так и при действии стрессорных факторов.

4.3. Действие биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на фертильность экспериментальных животных

В современном животноводстве преследуются, прежде всего, хозяйственные цели. Работников сельского хозяйства всех стран интересует повышение продуктивности животноводства при одновременном снижении стоимости продукции. С ростом хозяйственного использования животных значительно изменились и условия их содержания и кормления. Для достижения более высокого уровня продуктивности животных применяются во всевозрастающей степени комбикорма промышленного изготовления. Помимо этого требования к повышению продуктивных показателей

животных приводят к усиленной нагрузке на организм. В связи с этим могут наблюдаться различные функциональные сбои в работе систем и органов животных, в том числе и в репродуктивной системе [29]. В литературе имеют место сообщения о том, что применение комплексных препаратов микробного происхождения, в частности, на основе представителей рода *Streptomyces* способствует повышению продуктивности животных [146]. В связи с изложенным выше нами было исследовано влияние биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на плодовитость опытных животных.

Исследования проводили на 36 белых лабораторных крысах обоих полов. Для проведения эксперимента животные (как самцы, так и самки) были разбиты на опытную и контрольную группы. В опытных группах животные предварительно в течение 90 дней к основному рациону питания получали высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Животные контрольной группы получали в тот же промежуток времени стандартный рацион питания. Затем производили подсадку самцов к самкам.

Опыты на белых крысах-самках показали, что применение биомассы исследуемого штамма в качестве добавки к основному рациону у опытных животных до, во время и после беременности не оказало отрицательного влияния на их организм. В течение эксперимента не отмечалось осложнений в протекании беременности и родов у опытных животных по сравнению с контролем (Таблица 4.2).

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

Исследуемые показатели	Группы животных	
	Контрольная (стандартный рацион питания)	Опытная (стандартный рацион питания + биомасса)
Количество новорожденных крысят на одну самку, абс.	8,00±1,81	11,33±1,65
Индекс плодовитости, % к контролю	100,00±0,01	135,50±7,85
Постнатальная смертность крысят через 3 недели, %	7,07±3,07	0
Масса тела новорожденных крысят, г	5,72±0,22	6,77±0,77
<i>Динамика массы тела крысят, г</i>		
10 дней	14,99±1,01	17,22±1,06
20 дней	21,73±0,93	30,73±1,30
30 дней	35,17±5,56	35,83±6,00

Примечание: P<0,05

Индекс фертильности, отражающий способность самок и самцов к оплодотворению, и гестации, несущий информацию преимущественно о способности к вынашиванию беременности, у подопытных животных составил 100,0%.

Результаты исследования влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на фертильность взрослых особей и развитие крысят в постнатальный период их жизни показали, что кормление животных кормом с добавлением биомассы исследуемого штамма способствовало увеличению количества родившихся крысят на 1 самку, индекса плодовитости самок белых крыс (число родившихся крысят/число родивших самок) на $35,50 \pm 7,85\%$ по сравнению с показателями животных контрольной группы, кроме того в опытной группе не зафиксировано ни одного летального исхода (Таблица 4.2).

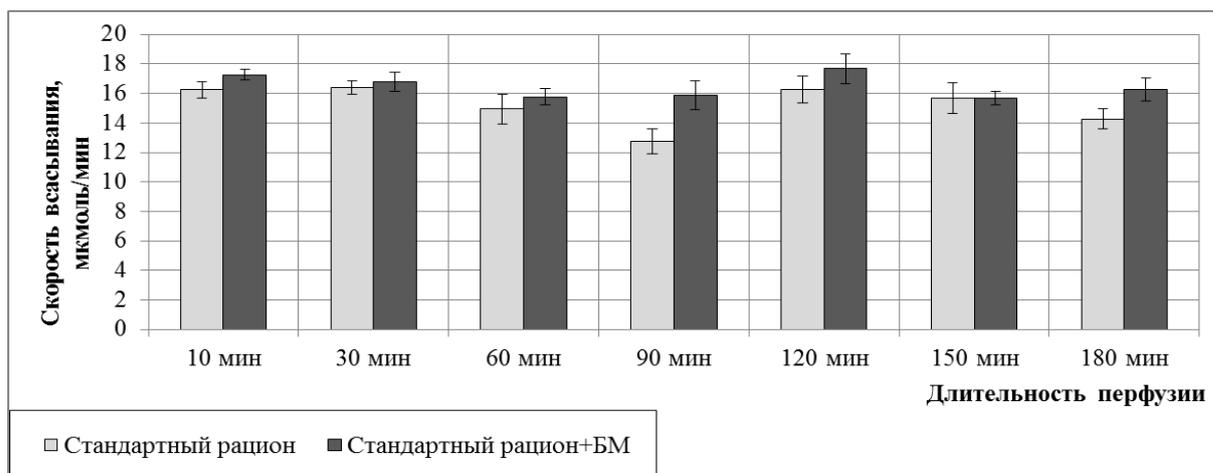
4.4. Всасывание пищевых веществ в тонкой кишке под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

Всасывание, наряду с другими этапами ассимиляции пищи, является необходимой составляющей сложного процесса питания, которое представляет собой один из детерминирующих факторов обеспечения жизнедеятельности организма, влияя на все морфологические, биохимические и физиологические процессы [88]. Установлено, что процесс всасывания пищевых веществ в тонкой кишке весьма чувствителен к воздействию стрессовых факторов, в частности, стрессирование приводит к существенным изменениям всасывания глюкозы, главного поставщика энергии в клетках органов и тканей, и аминокислот, что может привести к развитию различных патологий в желудочно-кишечном тракте [97].

Исследование влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на всасывание пищевых веществ в тонкой кишке проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 180-220 г, которым предварительно в течение 2 месяцев, а затем на протяжении эксперимента добавляли биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 к стандартному рациону питания. В качестве стрессора использовали жесткую иммобилизацию животных. Хроническое стрессирование проводили в течение 2-х часов ежедневно на протяжении 45-ти суток. Скорость всасывания глюкозы и фруктозы в опытах *in vivo* определяли в перфузионных растворах, полученных спустя 5 часов после окончания каждого 2-х часового стрессирования на 1, 3, 7, 15, 30, 45 сутки хронического стрессирования. Контролем служили животные, содержащиеся в обычных условиях, получавшие стандартный рацион питания, а также крысы со стандартным рационом питания, подвергавшиеся стрессированию [90, 98].

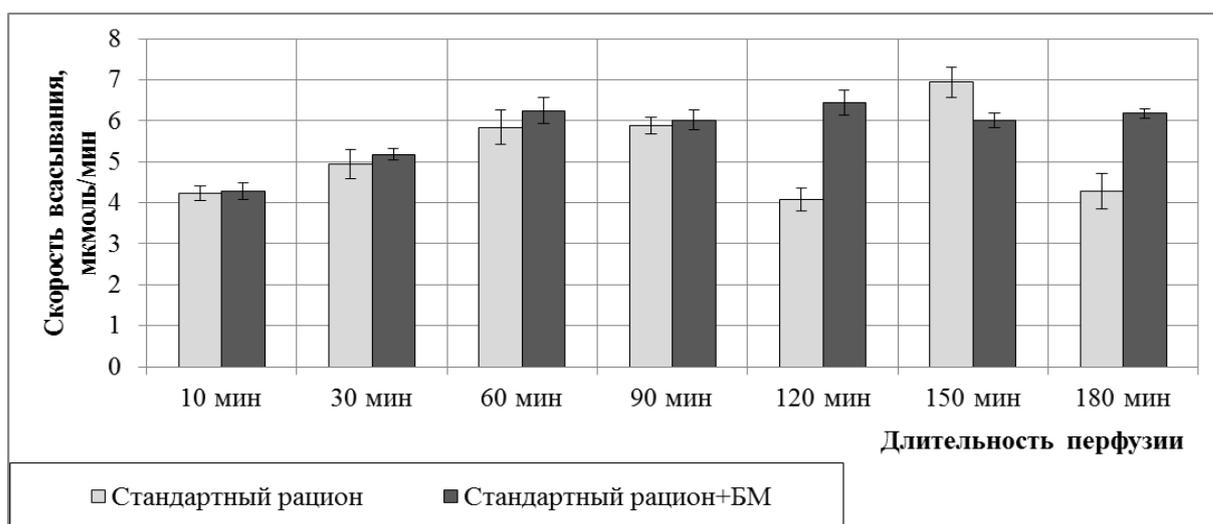
Полученные нами данные свидетельствуют, что потребление животными биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в течение 2 месяцев вызывает

незначительное повышение всасывания глюкозы и фруктозы в тонкой кишке, в большинстве случаев различия недостоверны (Рисунок 4.4, 4.5).



Примечание: P<0,05

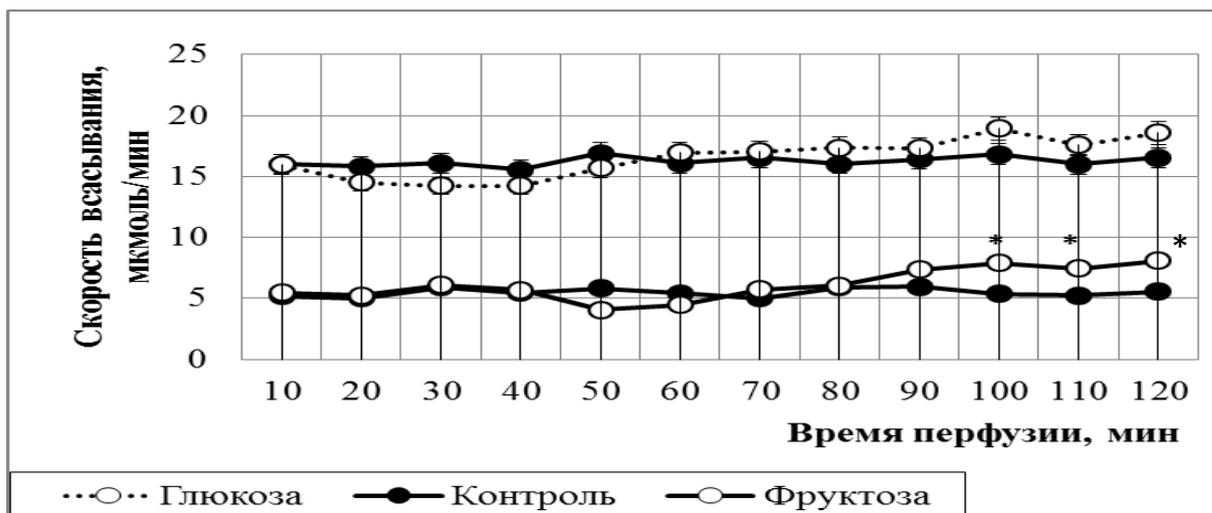
Рис. 4.4. Всасывание глюкозы (50мМ) в тонкой кишке в условиях потребления биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11



Примечание: P<0,05

Рис. 4.5. Всасывание фруктозы (50мМ) в тонкой кишке в условиях потребления биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

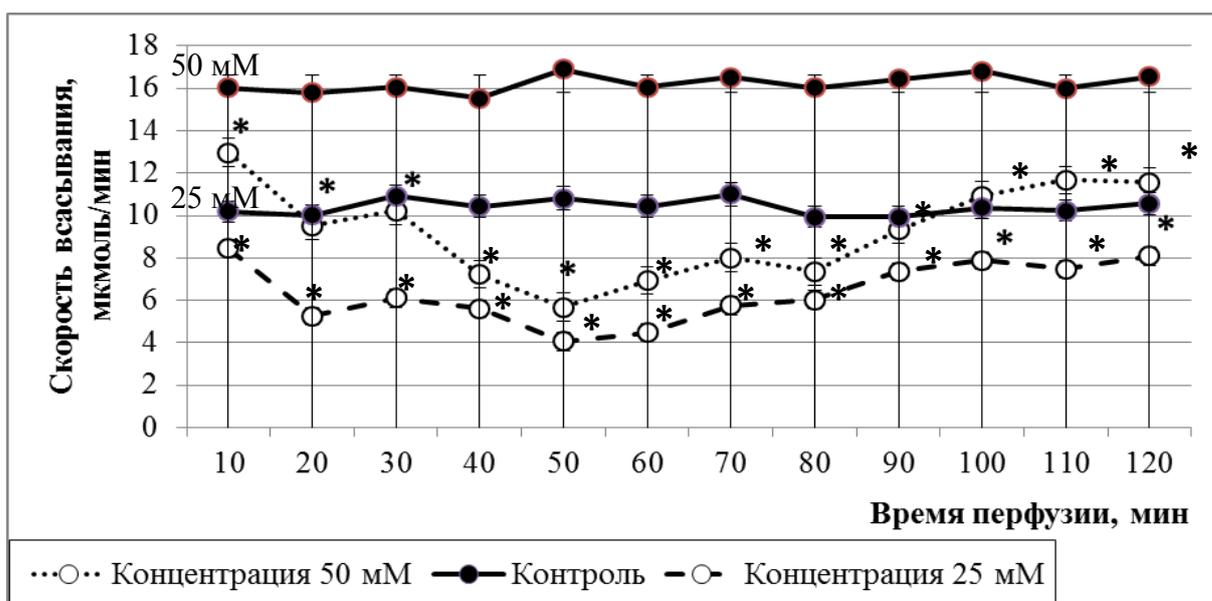
В опытах *in vivo* перфузия изолированной петли раствором биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (1 и 2 мМ) также не привела к изменению скорости всасывания глюкозы, в то время как на заключительном промежутке перфузии зафиксировано достоверное увеличение скорости всасывания фруктозы (Рисунок 4.6), что может быть связано, как с увеличением числа транспортеров фруктозы GLUT5, так и с повышением парацеллюлярного переноса этого моносахарида.



Примечание: * – достоверные различия под влиянием биомассы ($P < 0,05$).

Рис. 4.6. Динамика всасывания глюкозы и фруктозы (50 мМ) в изолированной петле тонкой кишки при введении биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (2 мМ) в перфузионный раствор (2 мМ)

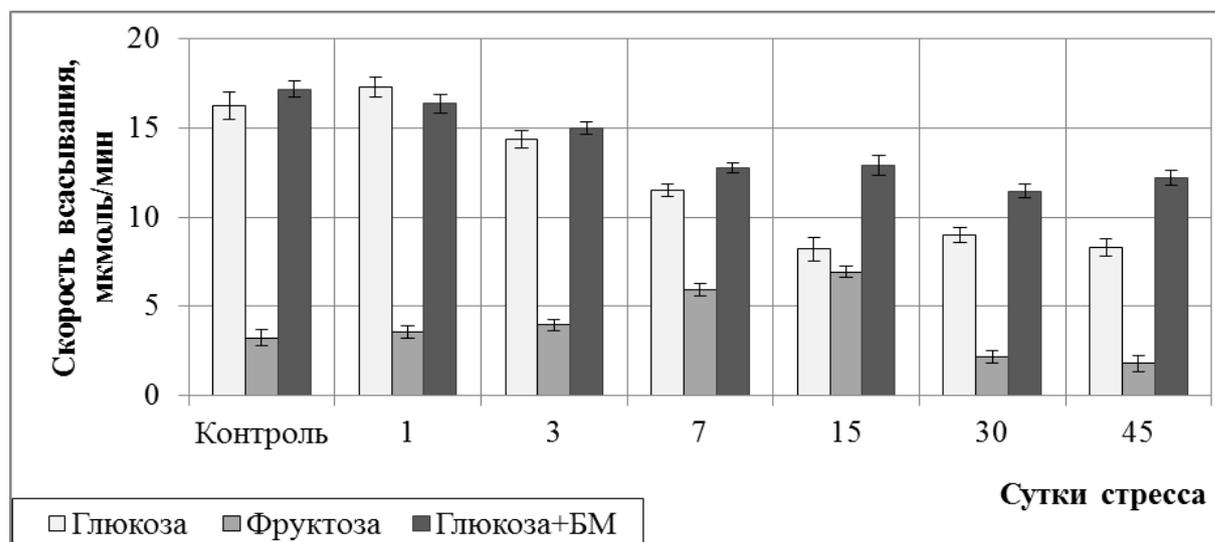
Установлено, что на протяжении острого стресса большой силы, вызванного жесткой иммобилизацией, происходит заметное снижение скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке. Скорость всасывания глюкозы достоверно ниже контрольного уровня уже спустя 10-30 минут после начала стрессирования и продолжает снижаться до 1-го часа действия стрессора. Затем скорость всасывания глюкозы несколько повышается по сравнению с ее уровнем при 1-часовом стрессировании, но остается существенно ниже, чем у контрольных животных (Рисунок 4.7).



Примечание: * – достоверные различия под влиянием биомассы ($P < 0,05$).

Рис. 4.7. Динамика скорости всасывания глюкозы в изолированной петле тонкой кишки крыс в условиях жесткой иммобилизации

Последующие эксперименты показали, что на 7-е сутки хронического иммобилизационного стрессирования (спустя 5 часов после действия стрессора) всасывание глюкозы заметно ниже уровня контроля, а фруктозы – выше, т.е. восстановления не происходит. Продолжение периодического воздействия стрессового фактора привело к более глубоким изменениям транспорта моносахаридов на 15-е сутки, когда скорость всасывания отличалась от контроля почти в 2 раза (Рисунок 4.8).



Примечание: $P < 0,05$

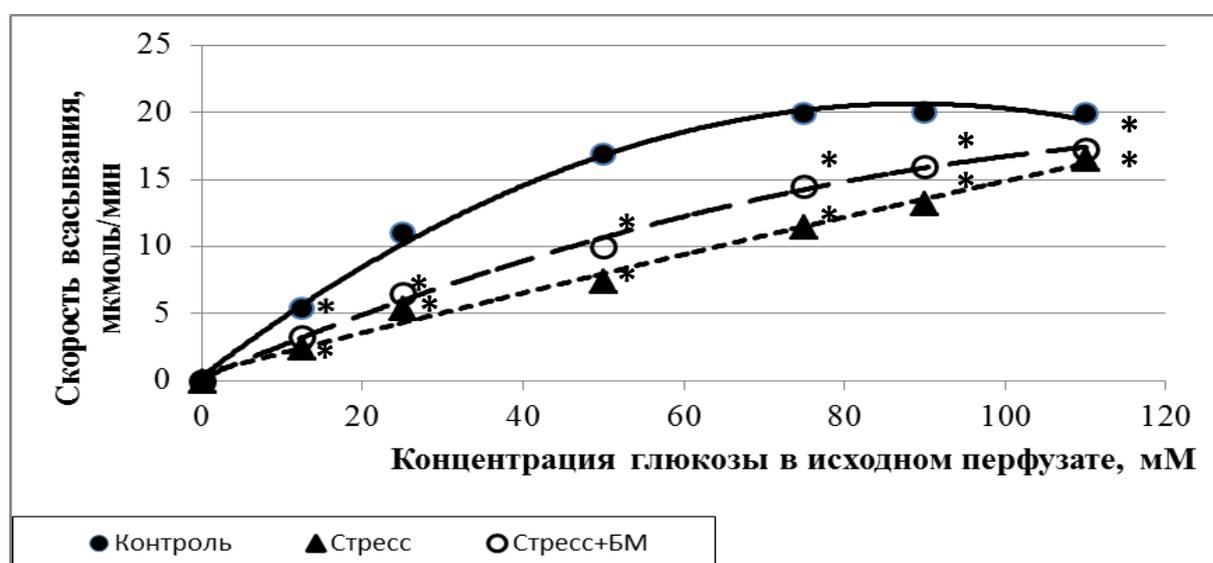
Рис. 4.8. Всасывание в тонкой кишке глюкозы (50 мМ) в условиях хронического стресса и при стрессе под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, а также фруктозы (50 мМ) при стрессировании

Всасывание глюкозы осталось практически неизменным на протяжении 15, 30 и 45-ти суток стрессирования и стабилизировалось на уровне около 8–8,5 мкмоль/мин. В отличие от всасывания глюкозы, увеличение скорости всасывания фруктозы на 7 и 15-е сутки стрессирования сменилось ее уменьшением на 30-е и особенно 45-е сутки. Следовательно, в условиях потребления животными биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 снижение интенсивности всасывания глюкозы (50 мМ) в тонкой кишке при хроническом стрессе менее выражено, что, предположительно, связано с протекторным действием биомассы.

Таким образом, на начальном этапе стрессирования наблюдались разнонаправленные перестройки деятельности транспортных систем для глюкозы и фруктозы, в то время как на заключительном изменении всасывания обоих моносахаридов несло сходный характер: здесь произошла адаптация на более низком уровне. Спустя 1 и 3 суток после окончания стрессирования скорость всасывания моносахаридов уменьшилась ниже уровня контроля, т.е. восстановления первоначального уровня стрессирования не

произошло, что свидетельствует о возникновении стойких адаптивных перестроек транспортной функции тонкой кишки.

В условиях стресса наблюдались изменения основных кинетических характеристик всасывания глюкозы в тонкой кишке. Характер кинетической кривой всасывания глюкозы на 15-е сутки стресса существенно изменился, кривая приобрела более сглаженный вид, больше характерный для пассивного транспорта, характерного для фруктозы. Применение биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 привело к частичной нормализации кинетических характеристик всасывания глюкозы в тонкой кишке. Характер кривой стал более естественным для обычных условий (выпуклым), что свидетельствует о преобладании активного компонента транспорта (Рисунок 4.9).



Примечание: * – достоверные различия под влиянием биомассы (P < 0,05).

Рис. 4.9. Кинетика всасывания глюкозы в изолированной петле тонкой кишки крыс биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в условиях стресса (15 сутки)

Таким образом, исходя из анализа полученных данных, адаптивные перестройки всасывания глюкозы в тонкой кишке при стрессе и в условиях потребления биомассы связаны соответственно со снижением либо повышением эффективности функционирования системы активного транспорта глюкозы. Очевидно, именно по этой причине не было обнаружено изменений всасывания фруктозы под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при стрессе, а ее несущественные колебания в обычных условиях под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 связаны с изменениями интенсивности парацеллюлярного транспорта фруктозы в тонкой кишке. Учитывая хорошую корреляцию между мощностью системы активного транспорта глюкозы и содержанием транспортеров SGLT1 в апикальной мембране кишечной клетки, можно предположить, что резкое падение процесса всасывания при стрессе и его

увеличение под влиянием биомассы связано непосредственно с редукцией либо стимуляцией экспрессии мРНК переносчика SGLT1 и его транслокации в мембрану щеточной каймы. Результаты опытов с применением флоридзина и проведенные расчеты показывают также, что, наряду со снижением мощности системы активного транспорта, при стрессе возрастает относительная роль системы пассивного транспорта глюкозы, опосредуемой переносчиком GLUT2, и парацеллюлярного транспорта, в то время как под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 эти показатели приближаются к значениям контроля.

Известно, что стрессовые воздействия большой силы, независимо от их природы, приводят к активизации процесса ПОЛ с усилением образования и накопления продуктов этой реакции, в том числе, в эпителии кишечника, что приводит к окислительной модификации и деструкции макромолекул мембран и других органелл клеток [28]. При этом наблюдается угнетение антиоксидантной защиты (активность супероксиддисмутазы, каталазы и др.) в различных органах и тканях организма. Показано, что увеличение интенсивности ПОЛ, сопровождающееся истощением антиоксидантных систем, является одним из факторов, приводящих к угнетению всасывания пищевых веществ в тонкой кишке при стрессе [97]. По данным литературы, стрептомицеты синтезируют БАВ, стабилизирующие систему антиоксидантной защиты организма [73]. Поэтому вышеуказанный эффект может быть связан и с защитным по отношению к влиянию хронического стрессирования действием компонентов биомассы штамма.

Таким образом, длительное применение биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 способствует частичной нормализации всасывания активно транспортируемых нутриентов (глюкозы и фруктозы) в тонкой кишке в условиях хронического стресса, что может быть применено при профилактике и коррекции стрессовых нарушений пищеварительных функций у животных.

4.5. Нейрофизиологические аспекты оборонительного поведения экспериментальных животных разных возрастных групп, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

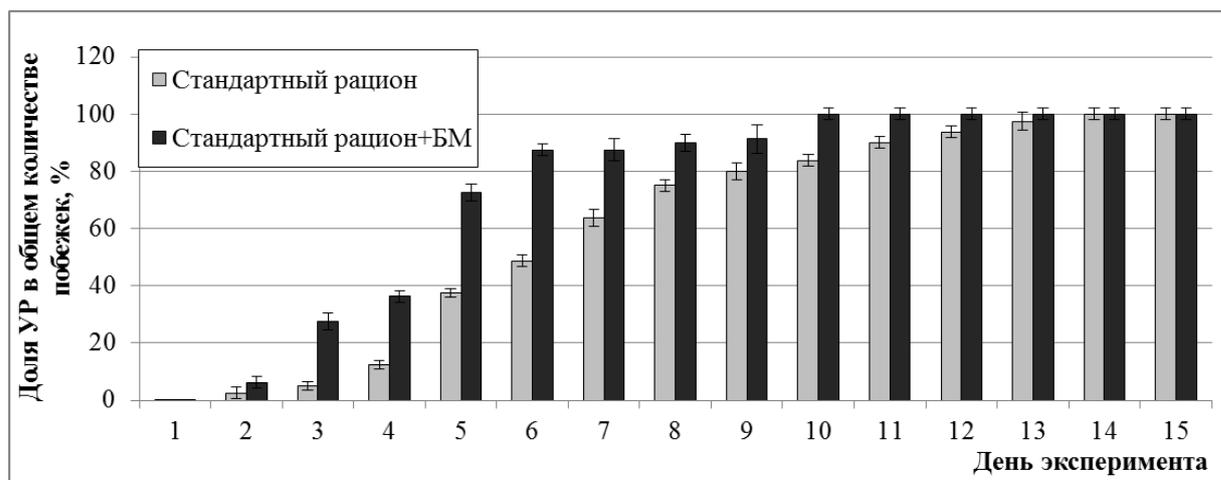
Штаммы различных видов *Streptomyces* хорошо зарекомендовали себя как продуценты вторичных метаболитов, обладающих фармацевтически релевантными свойствами: противовоспалительная, противовирусная, противомикробная, противораковая активность [106].

Несмотря на увеличивающееся число сообщений о воздействии продуктов жизнедеятельности стрептомицетов на нейрональные процессы, их влияние на поведение животных очень мало исследовано. При изучении воздействия метаболитов *Streptomyces avermectilis* и *Streptomyces lincolniensis* на поведенческие реакции белых крыс был выявлен, в частности, их анксиолитический эффект [196]. Ранее было обнаружено, что длительное потребление белыми крысами обоих полов культуральной жидкости и особенно биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-36, выделенного из почв Молдовы, облегчает процесс обучения навыку активного избегания, а также способствует увеличению скорости целенаправленных двигательных реакций [96].

Поэтому представляло интерес исследовать влияние длительного потребления биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на процесс выработки оборонительных условных рефлексов у белых крыс разного возраста (молодых и старых). Исследования выполнены на 36 лабораторных крысах-самцах линии *Wistar* двух возрастных групп (молодые и старые), содержащихся в условиях вивария. Животные обеих возрастных групп (молодые, начиная с возраста 1 месяц, а старые, начиная с возраста 13 месяцев) в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания в течение 90 суток получали высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 с определенным ранее аминокислотным, углеводным и липидным составом. Спустя 90 суток после начала потребления животными биомассы приступили к выработке у них условных рефлексов. На протяжении эксперимента по выработке условных рефлексов (15 дней) животные продолжали получать с кормом высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. В качестве контроля служили крысы соответствующих возрастных групп, содержащиеся в тот же промежуток времени на стандартном рационе питания. В опытах использовался метод выработки искусственного экстрорецепторного рефлекса, а именно, условной двигательной реакции активного избегания болевого стимула. Обучение крыс проводили по методике двустороннего активного избегания в челночной камере после 5-ти минутного привыкания к экспериментальной обстановке [43].

В результате проведенных исследований было обнаружено, что у молодых крыс (в возрасте 4 месяца), получавших в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, число условно-рефлекторных реакций намного выше, чем у животных контрольной группы. В динамике условно-рефлекторной деятельности их доля в процентном отношении

достоверно выше у крыс опытной группы со 2-го по 11-й день эксперимента по выработке условных рефлексов (Рисунок 4.10).



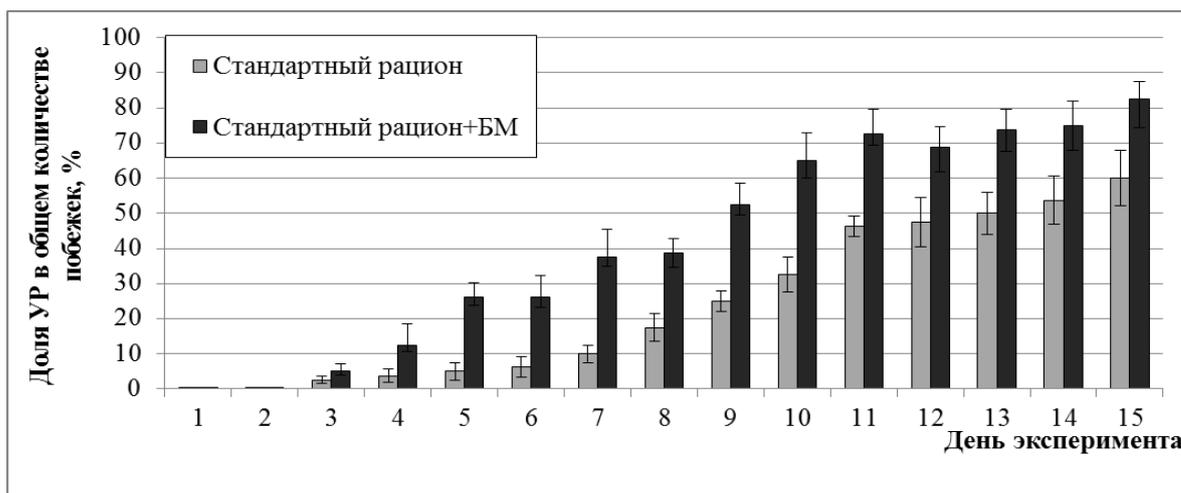
Примечание: $P < 0,05$

Рис. 4.10. Динамика условно-рефлекторной деятельности молодых крыс под влиянием длительного потребления биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

Особенно существенные различия между животными опытной и контрольной групп зафиксированы на начальном этапе обучения – со 2-го по 6-й дни эксперимента по выработке условных рефлексов, когда количество условно-рефлекторных побегов у крыс, потреблявших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, было выше в 2–5 раз. Следует также особо отметить тот факт, что применение биомассы в качестве пищевой добавки способствовало более раннему достижению 100,0%-го уровня выработки условных рефлексов. Так, если у контрольных животных максимальный уровень выработки условного рефлекса был достигнут лишь на 14-е сутки, то у животных опытной группы – на 10-е. Следовательно, длительное потребление биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 оказывает заметное позитивное влияние на процесс формирования условно-рефлекторных связей, способствуя существенной интенсификации процесса обучения навыку активного избегания у самцов белых крыс.

Согласно полученным и представленным на рисунке 4.11 результатам, у старых животных (в возрасте 16-ти месяцев) условные реакции активного избегания болевого стимула вырабатываются гораздо медленнее, чем у молодых (Рисунок 4.10). Так, например, на 5-й день эксперимента по выработке условных рефлексов доля условно-рефлекторных побегов в их общем количестве составила у молодых животных, получавших биомассу, более 72,0%, в то время как у старых – 26,0%, на 10-й день молодыми животными был достигнут 100%-й уровень выработки условных рефлексов, у

старых животных доля условно-рефлекторных побегок составила около 65,0% (Рисунок 4.10, 4.11).



Примечание: $P < 0,05$

Рис. 4.11. Динамика условно-рефлекторной деятельности старых крыс под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

Потребление животными, начиная с 13-месячного возраста, в течение 90 дней биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 способствовало существенному увеличению у них числа условно-рефлекторных реакций практически на всем протяжении эксперимента. В отличие от старых животных контрольной группы, у которых наибольший уровень выработки условных рефлексов не превысил 61,0%, у крыс, получавших в качестве пищевой добавки биомассу исследуемого штамма, этот показатель составил более 82,0%.

При сравнении результатов эффективности биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, полученных на молодых и старых животных, видно, что у старых крыс действие биомассы в отношении условно-рефлекторной деятельности заметно более выражено. Так, например, на 5-й день эксперимента по выработке условных рефлексов употребление биомассы приводит к увеличению доли условно-рефлекторных реакций в общем количестве побегок у молодых крыс более чем в 2 раза, а у старых – более чем в 5 раз, на 10-й день – у молодых животных – на 15,6%, а у старых – почти в 2 раза (Рисунок 4.10, 4.11).

Как видно, длительное потребление биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 приводит к заметному облегчению процесса обучения молодых белых крыс навыку активного избегания и особенно существенно способствует стимуляции условно-рефлекторной деятельности старых животных [2, 11, 95]. Столь высокую эффективность длительного потребления биомассы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в отношении

условно-рефлекторной деятельности экспериментальных животных можно объяснить высоким содержанием в ней таких аминокислот, как глутаминовая, аспарагиновая, глицин, пролин [16], являющихся нейромедиаторами и нейромодуляторами в различных отделах головного мозга, тем самым, обеспечивая формирование механизмов нейропластичности в процессе обучения [182], фосфолипидов и стероидов [69], оказывающих влияние на процессы синаптической пластичности нейронов, а также, предположительно, метаболитов, способных стимулировать и поддерживать нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти (витаминов группы В, ненасыщенных жирных кислот, флавоноидов, антоцианов и др.) [143].

В то же время, необходимо помнить, что болевой электрокожный раздражитель, применяемый при выработке оборонительных условных рефлексов в качестве условного стимула, является достаточно сильным стрессовым фактором для подопытных животных. Хорошо известно, что в состоянии острого стресса происходит резкое повышение интенсивности ПОЛ в нервных клетках на фоне угнетения антиоксидантной защиты, что может привести к окислительным изменениям и последующему разрушению макромолекул мембран нервных клеток, трансформации регуляторных структур и синаптических транспортеров и, в конечном счете, отрицательно сказывается на процессах памяти и обучения [89, 116].

Как уже было упомянуто ранее, из различных штаммов стрептомицетов выделен ряд «новых» ингибиторов ПОЛ и показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной пероксидации [161, 163]. Исходя из этого, можно предположить, что зафиксированный в работе эффект облегчения выработки оборонительных условных рефлексов под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, обусловлен нейропротекторным действием входящих в ее состав веществ по отношению к индуцируемой в условиях болевого стрессирования активации свободнорадикального окисления. Это предположение в определенной мере находит подтверждение в результатах экспериментов на старых животных. Низкий уровень выработки условных рефлексов у 16-месячных крыс по сравнению с молодыми животными, очевидно, опосредован развитием у них в этот период процессов нейродегенерации. Тот факт, что эффективность применения биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 у старых крыс существенно выше, чем у молодых животных, учитывая роль окислительного стресса в развитии возрастных нейродегенеративных изменений на фоне снижения активности многоуровневой антиоксидантной системы нервных клеток [28], свидетельствует в пользу предположения

о нейропротекторном механизме эффекта биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в отношении условно-рефлекторной деятельности. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейшего изучения метаболитов, продуцируемых штаммом *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, и их физиологических эффектов с целью выделения и идентификации веществ с нейропротекторными свойствами (возможно, «новых» ингибиторов перекисного окисления липидов) и последующего их использования для предупреждения развития нарушений, приводящих к преждевременной диминуции когнитивных процессов.

4.6. Влияние биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на отдельных представителей кишечной микрофлоры белых крыс

Микробиота – совокупность микроорганизмов (бактерии, вирусы, простейшие), которые обитают в организме человека и животных. Синонимами термина «микробиота» являются такие термины, как «микробиоценоз, нормальная микрофлора, резидентная микрофлора». Наиболее многочисленна микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) на всем его протяжении.

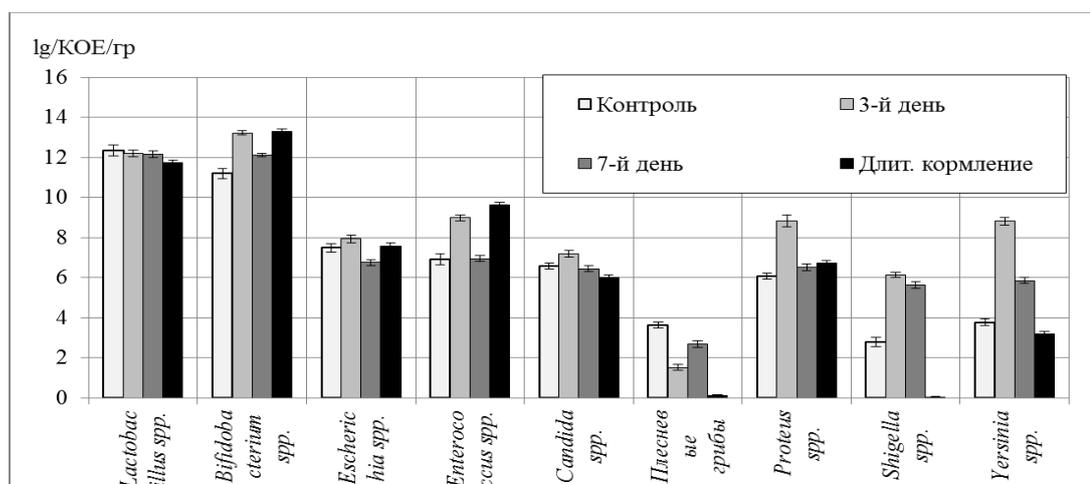
Количество видов микроорганизмов, заселяющих кишечник, составляет около 4000 [115]. Основными представителями микрофлоры кишечника являются бактерии класса *Actinobacteria* (в том числе, род *Bifidobacterium*), типов *Bacteroidetes* (в частности, род *Bacteroides*), *Firmicutes* (в том числе роды *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium* и *Ruminococcus*) и *Proteobacteria* (например, *Enterobacter spp.*). Распределение микроорганизмов в ЖКТ происходит неоднородно: желудок населяют немногочисленные лактобактерии, дрожжевые грибки, стафилококки и др., также выделяют *Helicobacter pylori*. Микрофлора тонкого кишечника в верхних отделах является достаточно бедной, здесь имеет место наличие лакто- и бифидобактерий, по мере приближения к илеоцекальному клапану многообразие микрофлоры увеличивается: здесь встречаются уже и энтерококки, *Escherichia coli*, бактериоиды и др. Разнообразием и многочисленностью отличается микрофлора толстой кишки, причем в ней локализовано более 70% всей микробиоты организма человека [67]. В этом отделе преобладают грамотрицательные и строго анаэробные бактерии. Кишечная флора, в основном, состоит из представителей родов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [145].

В настоящее время не вызывает сомнений, что нормальная микрофлора кишечника играет колоссальную роль в формировании и поддержании адаптивных возможностей организма теплокровных животных и его функциональных резервов, являясь

обязательным участником многих физиологических процессов, протекающих в органах и тканях макроорганизма: пищеварения, выделения, дыхания, дифференцировки клеток, регуляции газового состава полостей и жидкостей, водно-солевого обмена, физико-химического гомеостаза, метаболизма углеводов, белков, липидов, стероидов, желчных кислот, детоксикации экзо - и эндогенных субстратов и метаболитов, продукции биологически активных соединений [121, 145]. Вместе с тем о влиянии метаболитов различных штаммов стрептомицетов на состав и свойства микрофлоры кишечника до настоящего времени практически ничего не известно, поэтому нами была поставлена задача исследовать состав бактериоценоза кишечника при применении биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

Исследование проведено на 36 лабораторных белых крысах-самцах линии *Wistar* (одна опытная и одна контрольная группы). Предварительно к основному рациону питания добавлялась высушенная биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в течение 3-х месяцев. Далее исследовали состояние кишечной микрофлоры. Для исследования содержимого кишечника (фекалий) лабораторных крыс, проводили изучение полезной микрофлоры (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*), условно-патогенных представителей микробиоты (*Enterobacteriaceae*, *Candida spp.* и плесневые грибы) на соответствующих дифференциально-диагностических средах.

Анализ полученных данных свидетельствует, что при кормлении опытных животных биомассой состав кишечной микрофлоры претерпел некоторые изменения. Так, количество бактерий *Lactobacillus spp.*, являющихся продуцентами молочной кислоты, практически не изменилось (Рисунок 4.12).



Примечание: $P < 0,05$

Рис. 4.12. Изменение микрофлоры кишечника при добавлении в стандартный рацион биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в обычных условиях

Содержание микроорганизмов *Bifidobacterium spp.*, которые осуществляют следующие функции: вырабатывают органические жирные кислоты, обеспечивая тем самым высокую антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, участвуют в утилизации пищевых субстратов, активизируют пристеночное пищеварение [94], на 3-й день кормления было увеличено на 18,0%, несколько уменьшилось – на 7-й день, затем возросло на 19,0% относительно контрольных показателей на фоне длительного применения биомассы. Количество бактерий *Escherichia coli* (с нормальными ферментативными свойствами), которая синтезирует витамин К, предотвращает развитие патогенных микроорганизмов в кишечнике [94], практически не изменилось по сравнению с контролем. Содержание *Enterococcus spp.* значительно выросло на 3-й день кормления и на фоне длительного применения биомассы: на 30,0% и 39,0% по сравнению с контрольными значениями соответственно. Количество таких микроорганизмов, как *Candida spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, изменилось сходным образом, показав увеличение роста по сравнению с контролем на 3-й день, снизившись на 7-й и на фоне длительного применения биомассы по сравнению с контролем. Содержание *Proteus spp.* повысилось на 3-й день кормления на 45,0%, уменьшившись к 7-му дню и на фоне длительного кормления, но показывая увеличение на 10,0% относительно контрольных показателей. Плесневые грибки показали уменьшение на 58,0% на 3-й день применения биомассы, несколько увеличились к 7-му дню и практически не обнаружались при кормлении на протяжении 3-х месяцев (Рисунок 4.12) [15].

Уменьшение количества условно-патогенной микрофлоры у крыс из опытной группы под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 согласуется с данными, полученными в эксперименте с применением биомассы одного из штаммов вида *Streptomyces fradiae* при кормлении цыплят, где было показано уменьшение выраженности роста представителей оппортунистической микрофлоры [10].

Таким образом, можно сделать вывод о положительном влиянии на состав кишечной микрофлоры подопытных животных длительного применения биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

При некоторых состояниях организма (травмы, стресс, тяжелые операции, антибиотикотерапия и химиотерапия, неблагоприятные экологические условия и пр.) состав и количество микроорганизмов, населяющих организм в норме, может меняться, в результате чего возникает состояние дисбактериоза [89, 126]. Дисбактериоз – состояние, которое характеризуется уменьшением количества или элиминацией облигатной и

транзитной микрофлоры, увеличением количества резидентной условно-патогенной флоры. Спектр клинических синдромов и патологических состояний, связанных с изменением состава и функций микрофлоры организма весьма широк: диарея, запоры, колиты, нарушения всасываемости, гастриты, дуодениты, язвенная болезнь, коагулопатии, ишемия, гипо- и гиперхолестеринемия, поражения печени, суперинфекция, сепсис и др. [63].

Нарушение эволюционно выработанных взаимоотношений между отдельными представителями микробной экосистемы – как результат изменения окружающей среды, возрастания роли стрессовых факторов – ведет к снижению колонизационной резистентности с последующим развитием различных патологических состояний [154]. Стрессовые факторы ведут к изменениям в пищеварительной системе, которые складываются из снижения моторики, изменения секреторной и транспортной деятельности, что может вызывать нарушение барьерной функции кишечника. Состояние слизистой кишечника, поверхностный слой которого – слой слизи, состоящий из муцина, играет существенную роль в многофакторном процессе адгезии бактерий на поверхности слизистой. Физико–химическое состояние муцина легко может быть нарушено желчными кислотами, протеолитическими ферментами, колебаниями рН. При этом резко уменьшается содержание муцина, кислых мукополисахаридов на поверхности слизистой и в покровных клетках. Помимо вышеперечисленного, стрессовая ситуация создает условия к изменению адгезивных свойств бактерий, что значимо с точки зрения эндогенной контаминации и метаболических последствий повышенного бактериального роста в кишечнике [63].

В последние годы пристальное внимание обращается на способы коррекции состава микрофлоры кишечника сельскохозяйственных животных [50, 78]. Это связано с тем, что интенсивный характер выращивания поголовья животных негативно влияет на микробиологическое состояние ЖКТ. Часто это приводит к развитию дисбиоза, коррекция которого весьма сложна. Также на организм животных оказывают влияние и другие факторы: нерациональное применение химиотерапевтических средств, в том числе и для лечения дисбиоза, рост числа стрессовых ситуаций, обусловленных разнообразными издержками, наблюдающимися в ходе технологического процесса: взвешивание, взятие крови, формирование групп, нарушение условий кормления и содержания, транспортировка [53, 74].

Все вышеперечисленные факторы приводят к формированию качественных и количественных изменений микрофлоры кишечника, которые выражаются снижением,

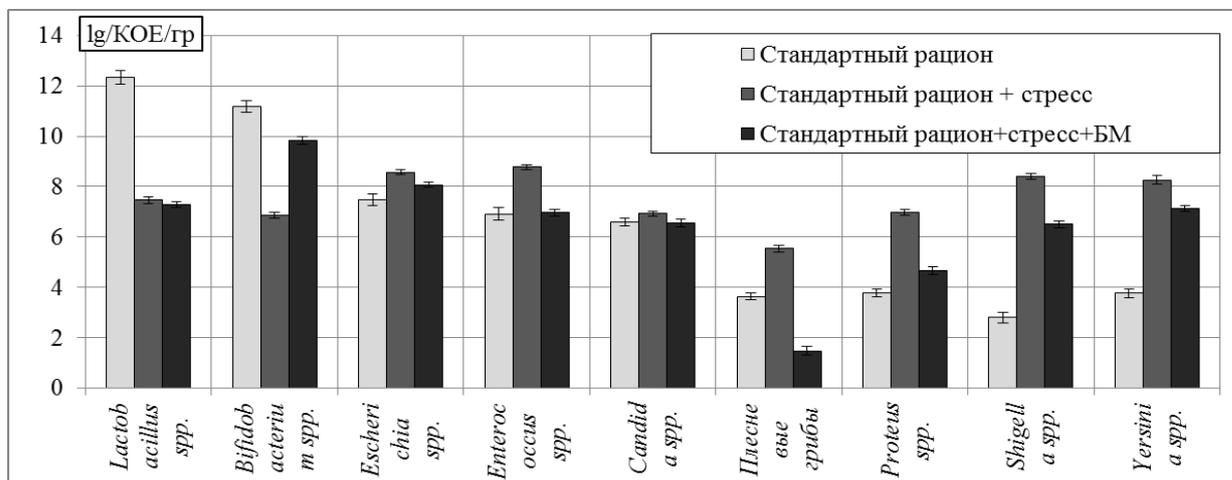
вплоть до редукции, количества бифидобактерий, ослаблением кислотообразующей активности лактобацилл, появлением несвойственных микроорганизмов, накоплением потенциала патогенности условно-патогенных представителей аутомикрофлоры с последующей колонизацией ими и длительным персистированием. Наблюдается обеднение облигатной микрофлоры кишечника до 1–2 видов. Наряду с этим, наблюдается интенсивный рост представителей условно-патогенной флоры, например, *Candida albicans* [115].

В окружающей среде имеет место действие многочисленных стрессорных факторов. Необходимо изучение влияния этих факторов на отдельные показатели организма теплокровных животных, в частности на микрофлору кишечника. Нами были смоделированы иммобилизационный и тепловой стрессы, которым животных подвергали в течение 2-х недель, далее исследовали состав кишечной микрофлоры.

Для исследования влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на отдельных представителей кишечной микрофлоры при иммобилизационном стрессе были отобраны 36 самцов белых крыс линии *Wistar*, взятых в 4-недельном возрасте и содержащихся в условиях вивария. Животные были разделены на опытную и контрольные группы. Животные опытной и одной контрольной групп подвергались иммобилизации в течение 2-х недель, далее следовал восстановительный период. Предварительно перед проведением стрессирования в течение 3-х месяцев, а также во время воздействия стрессорных факторов и в восстановительный период, животные опытной группы получали вместе с основным рационом биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Животные контрольных групп получали стандартный рацион питания, при этом животные второй контрольной группы не подвергались действию стресс-факторов.

В условиях хронического стрессирования произошло изменение состава кишечного бактериоценоза. Так, содержание *Lactobacillus spp.* на 14 день иммобилизационного стресса у крыс со стандартным рационом питания уменьшилось на 39,6%, у потреблявших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 также уменьшилось на 41,0% по отношению к контролю. Снижение количества *Bifidobacterium spp.* у крыс, получавших биомассу, составило 12,0%, а у животных с обычным рационом – 38,6% относительно контроля. Значительно увеличилось количество условно-патогенных микроорганизмов (*Shigella spp.* и *Yersinia spp.*): у крыс со стандартным кормом – на 200,0 и 119,5%, а у опытных животных – на 132,4 и 89,3% соответственно. Количество *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.* незначительно увеличилось у крыс, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, тогда как у животных, получавших стандартный

рацион, увеличение содержания составило 14,6% – для *Escherichia coli* и 26,9% – для *Enterococcus spp.* по сравнению с контролем. Количество плесневых грибов уменьшилось на 59,3% у опытных животных, а у крыс с обычным кормом увеличилось на 52,6% относительно контрольных показателей (Рисунок 4.13).



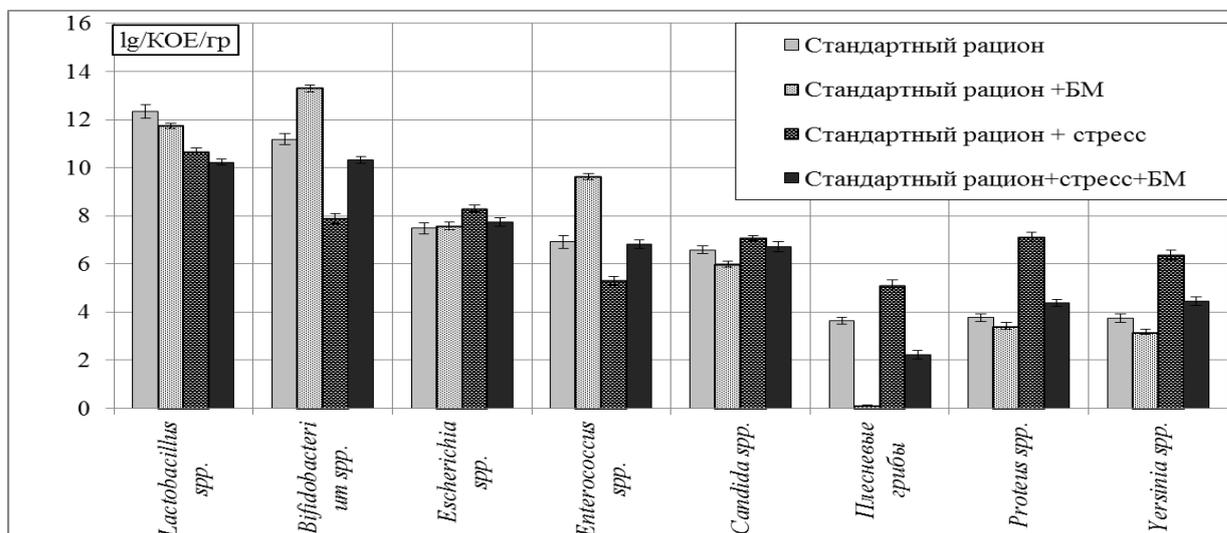
Примечание: P<0,05

Рис. 4.13. Изменение микрофлоры кишечника под действием биомассы штамма

Streptomyces fradiae CNMN-Ас-11 при иммобилизационном стрессе

Проведенные исследования по изучению влияния теплового стресса на микрофлору кишечника выявили изменения, схожие с изменениями в составе кишечной микрофлоры, полученными в результате 2-недельного иммобилизационного стресса, но менее выраженные (Рисунок 4.13, 4.14). Так, уменьшение содержания *Lactobacillus spp.* относительно контроля составило 13,6% при стрессировании животных с обычным рационом питания, 17,2% – у крыс, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Содержание *Bifidobacterium spp.* уменьшилось на 29,5% у стрессированных крыс со стандартным рационом питания, у стрессированных животных, получавших биомассу, падение менее выражено – 7,7% по сравнению с контрольными цифрами. У стрессированных животных с обычным рационом увеличение количества *Escherichia coli* составило 11,1% относительно контроля, у стрессированных и нестрессированных животных, получавших биодобавку в течение 3-х месяцев, количество *Escherichia coli* практически не изменилось. Содержание *Enterococcus spp.* у стрессированных животных, получавших обычный рацион, уменьшилось на 23,2% по отношению к контрольным показателям, у стрессированных животных, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, также незначительно снизилось по сравнению с контролем. Количество плесневых грибов и *Candida spp.* увеличилось у стрессированных животных со стандартным рационом, на 40,7 и 7,4% относительно контроля соответственно, у

животных, кормленных биомассой, содержание плесневых грибов уменьшилось на 38,6%, а микроорганизмы *Candida spp.* несколько увеличились. Содержание *Yersinia spp.* значительно увеличилось у стрессированных животных со стандартным рационом – на 70,0%, у стрессированных крыс, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, рост количества *Yersinia spp.* составил 18,6% (Рисунок 4.14).



Примечание: P<0,05

Рис. 4.14. Изменение микрофлоры кишечника под действием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 при тепловом стрессе

Таким образом, проанализировав данные, полученные в опытах по изучению влияния хронического стрессирования на микрофлору кишечника, в том числе и при потреблении биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, можно сделать вывод о том, что во время длительного стресса нарастают дисбиотические явления, сопровождающиеся уменьшением количества бифидо- и лактобактерий и нарастанием числа условно-патогенных микроорганизмов, но применение биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 значительно редуцирует эти явления.

4.7. Прирост массы тела лабораторных животных под влиянием биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, полученной при культивировании на среде R с веществами из *Arthrospira platensis*

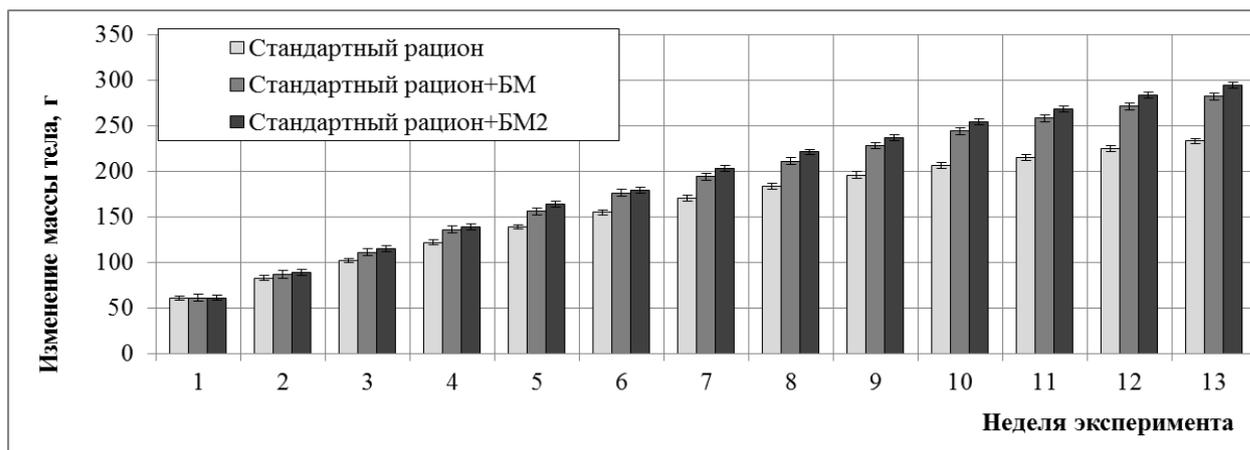
Последние два десятилетия XX века характеризуются появлением исследований, посвященных использованию биомассы микроводорослей в животноводстве, растениеводстве, медицине, пищевой и других отраслях промышленности. Было показано, что применение их в кормлении птицы, крупного и мелкого скота, свиней усиливает обмен веществ, повышает иммунитет к заболеваниям и сохранность молодняка [65, 76].

Нами была получена биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной среде R с добавлением BioR в концентрации 0,1%. Данная биомасса содержала липиды в количестве около 13% от общего количества. Содержание таких основных фракций, как фосфолипиды и стеринны, составляло 20,0% и почти 15,0% соответственно. Биомасса была богата белком: он составлял почти 37% от общего веса. Иммуноактивных и незаменимых аминокислот, которые обладают высокой биологической активностью, в биомассе содержалось 205,0 мг/г и 173,0 мг/г соответственно, а серосодержащих аминокислот, обладающих антиоксидантными свойствами – около 23,0 мг/г. На долю углеводов биомассы приходилось 19,6%.

Было проведено изучение влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной среде R с добавлением BioR в концентрации 0,1%, на привесы экспериментальных животных в обычных физиологических условиях и при действии стрессовых факторов.

Исследования проводили на 48 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar*, взятых в 4-недельном возрасте и содержащихся в условиях вивария. Для проведения эксперимента животные были разбиты на 2 группы по 24 крысы в каждой группе: контрольная и опытная.

Анализ полученных в результате проведенных экспериментов данных показал, что в обычных физиологических условиях кормление животных кормом, содержащим биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной среде R с 0,1% BioR, положительно влияет на прирост массы их тела (Рисунок 4.15).



Примечание: $P < 0,05$;

Рис. 4.15. Динамика массы тела белых крыс при добавлении в стандартный рацион биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением BioR (БМ2), в обычных физиологических условиях

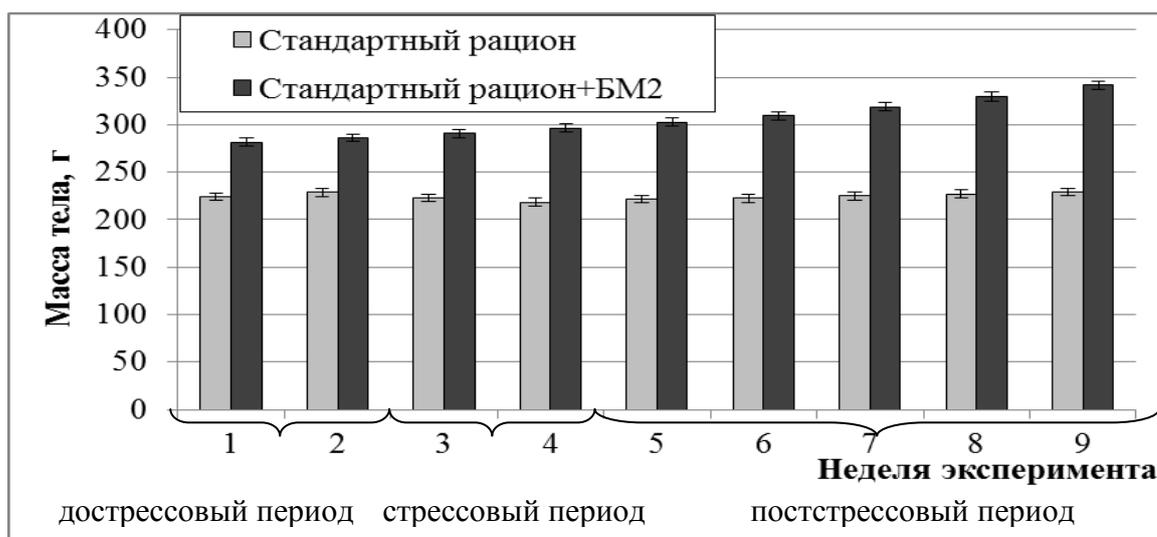
Скармливание животным такого корма привело к более выраженному увеличению массы их тела на протяжении 12 недель опыта по сравнению с контролем и опытной группой животных, получавших биомассу *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированную на среде R. Следует отметить, что к 9-12-ой неделе опытные животные имели больший вес, чем крысы контрольной группы, получавшие обычный рацион, на 30,0–33,0%, что показывает эффективность использования биомассы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, полученной на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR, в качестве пищевой добавки для увеличения продуктивности экспериментальных животных. Выявлено также, что к концу эксперимента масса тела опытных крыс превышала массу тела на 8,0–9,0% по сравнению с животными из группы, которая потребляла в качестве добавки к основному рациону биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированного на комплексной среде R (Рисунок 4.15).

Далее нами проведено изучение влияния биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированного на комплексной среде R с добавлением BioR (в концентрации 0,1%), на изменение массы тела животных при действии стрессорных факторов. В данном случае в качестве стресс-фактора выступал болевой электрокожный раздражитель, примененный при выработке оборонительных условных рефлексов в качестве условного стимула. Для проведения эксперимента были отобраны 24 белые лабораторные крысы-самцы линии *Wistar*, взятые в 4-недельном возрасте и содержащиеся в условиях вивария. Животные опытной группы в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания в течение 90 суток получали высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR, с определенным ранее аминокислотным, углеводным и липидным составом. Спустя 90 суток после начала потребления животными биомассы приступили к выработке у них условных рефлексов.

На протяжении эксперимента по выработке условных рефлексов (15 дней) животные продолжали получать с кормом высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. Контролем служили крысы со стандартным рационом питания. В опытах использовался метод выработки искусственного экстрорецепторного рефлекса.

Животные со стандартным рационом питания под воздействием стрессорного фактора потеряли в весе. У крыс, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, выращенного на среде R с добавлением 0,1% BioR, в качестве добавки к основному рациону, наблюдалось повышение массы тела в течение стрессового периода, причем динамика привесов была более выражена, чем у животных, получавших биомассу

штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на среде R. После 2-недельного применения чрезвычайного фактора у животных обеих групп проходил восстановительный период, в течение которого крысы опытной группы продолжали получать с основным рационом биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR. Дальнейшие наблюдения также показали нарастание массы тела у животных, потреблявших биомассу исследуемого штамма вместе с основным рационом. У крыс, получавших стандартный рацион питания, масса тела тоже увеличивалась, но в меньшей степени (Рисунок 4.16).



Примечание: $P < 0,05$;

Рис. 4.16. Динамика массы тела белых крыс при добавлении в стандартный рацион биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на среде R с добавлением BioR (БМ2), при действии стресса

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что при потреблении опытными животными корма с добавлением высушенной биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR, происходит увеличение прироста массы тела как в физиологических условиях, так и при действии стрессорных факторов, в большей степени, чем при скармливании биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной среде R.

4.8. Влияние биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, полученной на среде R с препаратом BioR, на нейрофизиологические аспекты оборонительного поведения экспериментальных животных

Как известно, вторичные метаболиты, продуцируемые штаммами различных видов *Streptomyces*, оказывают противовоспалительный, противовирусный, противомикробный,

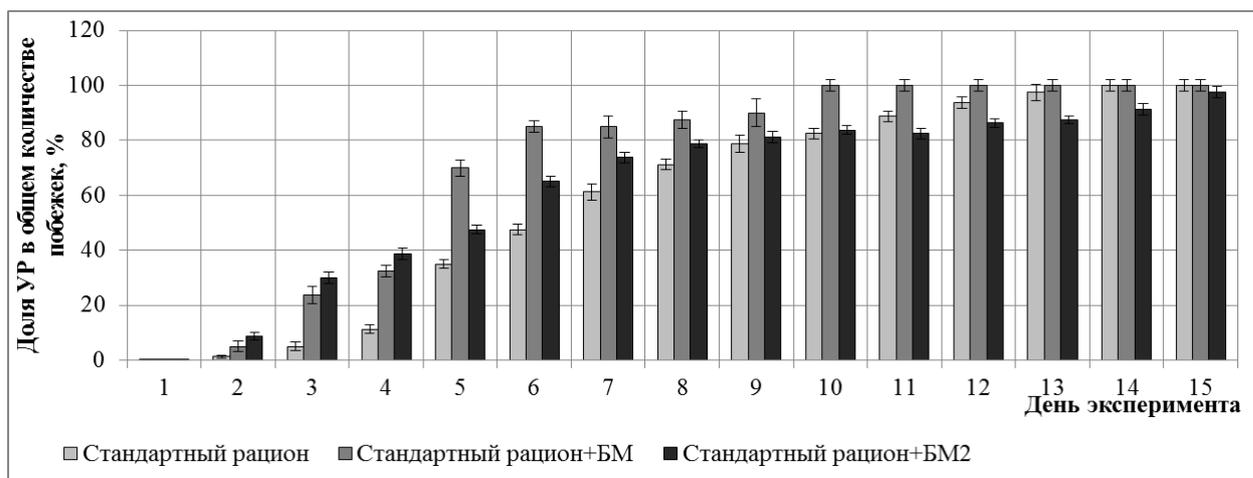
антиоксидантные эффекты [210]. В ряде исследований на модельных животных выявлены нейропротекторные свойства метаболитов различных штаммов стрептомицетов [161]. Кроме того, рядом исследователей показано, что некоторые из метаболитов стрептомицетов (лактацистин, ангидроэксфолиамицин, инубозины А, В, С и др.), оказывающие нейропротекторное действие при применении различных моделей нейродегенерации, обладают способностью стимулировать нейрогенез, оказывая влияние на ультраструктурную организацию различных нейрональных образований головного мозга [198], и дифференцировку нейральных стволовых клеток [104]. В связи с этим нами были проведены опыты, направленные на исследование влияния длительного потребления биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11, полученной на среде R с веществами из *Arthrospira platensis*, на процесс выработки оборонительных условных рефлексов у белых крыс.

Исследование выполнено на 24 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar*, взятых в 4-недельном возрасте и содержащихся в условиях вивария. Животные в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания в течение 90 суток получали высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11, полученную на среде R с 0,1% BioR, с определенным ранее аминокислотным, углеводным и липидным составом.

Спустя 90 суток после начала потребления животными биомассы приступили к выработке у них условных рефлексов. На протяжении эксперимента по выработке условных рефлексов животные продолжали получать с кормом высушенную биомассу. В качестве контроля служили крысы, получавшие в тот же промежуток времени стандартный рацион питания. В опытах использовался метод выработки искусственного экстрорецепторного рефлекса, а именно, условной двигательной реакции активного избегания болевого стимула. Обучение крыс проводили по методике двустороннего активного избегания в челночной камере после 5-ти минутного привыкания к экспериментальной обстановке [43].

Анализ полученных данных показал, что у крыс, которые получали высушенную биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR, количество условно-рефлекторных реакций намного выше, чем у животных контрольной группы, получавших обычный корм. В динамике доля условных рефлексов в процентном отношении выше у крыс опытной группы со 2-го по 10-й день эксперимента, особенно со 2-го по 4-й день, когда количество побегов превышало число условно-рефлекторных реакций на 1,0–9,0% и 2,0–5,0% у контрольных

животных и животных, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной среде R, соответственно (Рисунок 4.10, 4.17).



Примечание: $P < 0,05$;

Рис. 4.17. Динамика условно-рефлекторной деятельности крыс под влиянием длительного потребления биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением BioR (БМ2)

Однако важно обозначить, что применение биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR, не привело к 100,0%-му уровню выработки условных рефлексов. Тогда как у контрольных животных максимальный уровень выработки условного рефлекса был достигнут лишь на 14-е сутки, а у животных, получавших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на комплексной среде R, – на 10-е.

Следует отметить, что при проведении эксперимента по выработке условных рефлексов крысы, получавшие биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением 0,1% BioR, показали худшие результаты по сравнению с данными, полученными в ходе эксперимента с животными, потреблявшими биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, особенно в последнюю неделю эксперимента, но на начальных этапах (2–4-й дни) опытные животные, производили большее число побегов (Рисунок 4.17).

Таким образом, длительное потребление биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенного на комплексной среде R с добавлением BioR в концентрации 0,1%, приводит к облегчению процесса обучения белых крыс навыкам оборонительного поведения и способствует стимуляции условно-рефлекторной деятельности на начальных этапах применения.

4.9. Выводы по главе 4

Анализ результатов экспериментов, в ходе которых производилось изучение влияния биомассы и культуральной жидкости штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на некоторые морфологические, функциональные, репродуктивные показатели и поведенческие характеристики белых крыс в обычных физиологических условиях и в условиях хронического стресса, выявил следующее:

1. Добавление в корм биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 экспериментальным животным в течение длительного времени (90 суток) способствует увеличению прироста массы тела в обычных физиологических условиях и в условиях хронического стрессового воздействия, увеличению плодовитости в обычных физиологических условиях, а также увеличению интенсивности процессов всасывания активно транспортируемых пищевых веществ в тонкой кишке.

2. Применение в качестве пищевой добавки экспериментальным животным биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в течение длительного времени (90 суток) способствует заметному облегчению процесса обучения молодых белых крыс навыку оборонительного поведения в условиях периодического воздействия экстремальных факторов и особенно существенно способствует стимуляции условно-рефлекторной деятельности старых животных.

3. Использование в корм биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 в течение длительного времени (90 суток) приводит к увеличению количества облигатных представителей нормальной микрофлоры кишечника (*Bifidobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*) и снижению количества условно-патогенных бактерий (*Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, *Proteus spp.*), что положительно влияет на состав кишечной микрофлоры в обычных физиологических условиях, а также способствует уменьшению дисбиотических изменений бактериоценоза кишечника в условиях хронического стрессового воздействия.

4. Применение в качестве добавки к корму экспериментальным животным биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированного на комплексной среде R с добавлением BioR в концентрации 0,1%, в течение длительного времени (90 суток) способствует увеличению прироста массы тела в обычных физиологических условиях и в условиях хронического стрессового воздействия.

5. Потребление белыми крысами-самцами, начиная с возраста одного месяца, в течение 90 дней в качестве пищевой добавки биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивированного на комплексной среде R с добавлением BioR в

концентрации 0,1%, оказывает стимулирующее влияние на условно-рефлекторную деятельность, способствуя облегчению процесса обучения навыку активного избегания.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

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

1. Изучаемый штамм *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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) [112].

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-Ас-11 на стандартных агаризованных средах показала, что популяция изучаемого штамма гомогенна.

3. Выявлена различная степень активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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*) [107].

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) [1, 108].

5. Биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-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%) [17, 18, 95].

6. При длительном потреблении (90 суток) экспериментальными животными биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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 при длительном воздействии стрессорного фактора [15].

Решенная важная научная проблема состоит в определении биосинтетической активности штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 – продуцента БАВ, что позволяет управлять процессами увеличения количества биомассы, аминокислот 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 стеринны, а также незаменимых и иммуноактивных аминокислот рекомендуется вести культивирование штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-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-Ас-11, выращенного на комплексной среде R.

Предложения на перспективу. Основные результаты диссертации «Биосинтетические свойства *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 и физиологические эффекты биомассы на организм теплокровных животных (крыс)» представляют перспективу развития исследований, направленных на разработку комплексного биопрепарата на основе биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, способствующей увеличению прироста массы тела, плодовитости и стрессорезистентности животных, а также на определение в биомассе веществ с нейропротекторными и антиоксидантными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

În limba română

1. **Bereziuc Y.** 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 Științe reale și ale naturii, 2017, nr 6(106), p. 30-34.
2. Brevet de invenție MD 1180 Y. Procedeu de stimulare a formării reflexelor condiționate în perioada diminuării funcțiilor/ Șeptițchi V., **Bereziuc Iu.**, Burțeva S (MD). BOPI nr. 8/2017.
3. Burțeva S., Usafii A., Toderaș A. Variabilitatea formelor spontane a tulpinii *Streptomyces sp.* 36 producătoare de substanțe bioactive. În: Buletinul AȘM, Științele biologice și chimice, 1996, nr 4, p. 27-32.
4. Codreanu S. Sinteza orientată a ciancobalaminei și porfirinelor de către bacterii propionice. Autoref. tezei de dr. șt. biologice. Chișinău, 1995. 21 p.
5. Lazăr V., Măruțescu L.-G., Chifiriuc M.-C. Microbiologie generală și aplicată. București: Ed. Univers. București, 2017. 408 p.
6. Malschi D. Elemente de biologie, ecofiziologie și microbiologie. Cluj-Napoca: Bioflux, 2009. 634 p.
7. Manciu A. Variația indicilor masei corporale și ai microflorei intestinale la pui sub acțiunea biomasei de streptomicete. În: Lucrări șt. UASM, 2014, vol. 40, p. 215-218.
8. Rudic V. BioR. Biomedical and clinical studies. Chisinau: Elena V.I., 2007, 376 p.
9. Rudic V. și col. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău: Elena V.I., 2007. 365 p.
10. Starciuc N. et al. Biomasa din streptomicete ca element de optimizare a unor indici hematologici și microflorei intestinale la pui. In: Lucrări șt. UASM, 2014, vol. 40, p. 146-149.
11. Șeptițchi V., Bereziuc Iu., Burțeva S. Procedeu de stimulare a formării reflexelor condiționate în perioada diminuării funcțiilor. Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT 2017, ediția a XV-a, 15-18 noiembrie, Chișinău, p. 165-166.
12. Toderaș A. Particularitățile fiziologo-biochimice și biotehnologice ale tulpinii *Streptomyces massasporeus* 36 ca producător al substanțelor biologice active. Autoref. tezei de dr. șt. biologice. Chișinău, 2000. 21 p.

În limba rusă

13. Белявская Л.А. и др. Идентификация и антагонистические свойства почвенного стрептомицета *Streptomyces sp.* 100. В: Мікробіологічний журнал, 2016, т. 78, nr 2, с. 61-73.
14. Бергельсон Л.Д. Мембраны, молекулы, клетки. Москва: Наука, 1983. 240 с.

15. **Березюк Ю.** Влияние длительного применения биопрепарата на основе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 на состав кишечной микрофлоры белых крыс. В: ХИСТ, Всеукраинский журнал молодых ученых, вып. 19. Черновцы, 2017, с. 205.
16. **Березюк Ю.Н.** Аминокислотный состав биомассы штамма *Streptomyces fradiae* 19 из черноземов Молдовы. В: Актуальні питання розвитку біології та екології. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції. Вінниця, 2016, с. 203-206.
17. **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.
18. **Березюк Ю.Н.** и др. Влияние препаратов из стрептомицетов почв Молдовы на привесы теплокровных животных в обычных и стрессорных условиях. В: Биотехнология для сельского хозяйства и окружающей среды. Материалы XII Международной научно-практической конференции daRostim. Одесса, 2016, с. 37-38.
19. **Березюк Ю.Н.** Рост и липидообразование стрептомицетов почв Молдовы на синтетических и комплексных средах. В: Биология – наука XXI века. Материалы 19-ой Международной Пущинской конф. молодых ученых. Пущино, 2015, с. 413-414.
20. Боковикова Т.Н. и др. Влияние химических реагентов на устойчивость соединений фосфолипидов с неомыляемыми липидами. В: Известия ВУЗов. Пищевая технология, 1998, nr 5-6, с. 42-44.
21. Болормаа Ч., Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К. Характеристика *Streptomyces* из пустынных почв Монголии. В: Фундаментальные исследования, 2012, nr 9, с. 545-549.
22. Бондарцев А.С. Шкала цветов. Москва-Ленинград: Изд-во АН СССР, 1954. 28 с.
23. Братухина А.А. Естественная изменчивость и биосинтетическая активность актиномицетов *Streptomyces massaporeus*. Автореф. дисс. докт. биол. наук. Кишинев, 2012. 32 с.
24. Бурцева С.А. Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения). Автореф. дисс. докт. хаб. биол. наук. Кишинев, 2002. 35 с.
25. Бурцева С.А. и др. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на содержание белка и аминокислотный состав биомассы стрептомицетов. В: Электронная обработка материалов, 2012, nr 48(4), с. 76–82.
26. Бурцева С.А., Ракова Т.Н. Итоги и перспективы применения некоторых микробных препаратов в условиях специализированных хозяйств. В: Задачи молодых ученых

Молдавии по повышению эффективности науки в условиях специализации и концентрации с/х. Тезисы докл. республиканской конф. Кишинев, 1978, с. 38-39.

27. Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*, описание видов и компьютерная программа их идентификации. Киев: НД, 2003. 618 с.

28. Васенина Е.Е., Левин О.С. Окислительный стресс в патогенезе нейродегенеративных болезней: возможности терапии. В: Нейропротективная терапия, 2013, nr 3-4, с. 39-46.

29. Визнер Э. Кормление и плодовитость сельскохозяйственных животных. Москва: Колос, 1976. 160 с.

30. Гараева С.Н. и др. Актиномицеты почв Молдовы как перспективный источник иммуноактивных аминокислот для повышения адаптационных свойств молодняка сельскохозяйственных животных. În: Tehnologii moderne în agricultură și protecția mediului înconjurător. Sesiunea științifică. Chișinău, 2003, p. 25-31.

31. Гараева С.Н., Редкозубова Г.В., Постолатий Г.В. Аминокислоты в живом организме. Chișinău: AȘM, 2009. 552 с.

32. Гаузе Г.Ф. и др. Определитель актиномицетов. Москва: Наука, 1983, 248 с.

33. Гольдин Е.Б. Биологическая активность микроводорослей и значение в межвидовых взаимоотношениях. В: Экосистемы, их оптимизация и охрана, 2013, nr 9, с. 49–76.

34. Горлов И.Ф. и др. Новые подходы к производству говядины на основе современных биоинженерных технологий: монография. Элиста: КГУ, 2015. 150 с.

35. Громов Б.В. Ультраструктура синезеленых водорослей. Ленинград: Наука, 1976. 94 с.

36. 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.

37. Громовых Т.И. и др. Биологические особенности штамма *Streptomyces lateritius* 19/97-М, перспективы применения в растениеводстве. В: Биотехнология, 2005, nr 5, с. 37-40.

38. Гуминский А.А. и др. Руководство к лабораторным занятиям по общей и возрастной физиологии. Москва: Просвещение, 1990. 240 с.

39. Долидзе Д.А., Петрова И.С., Фениксова Р.В. Исследование комплекса протеолитических ферментов *Actinomyces fradiae* 119. В: Прикладная биохимия и микробиология, 1974, т. 10, nr 5, с. 721–728.

40. Евтушенко И.А., Соколова И.Е. Авермектины – БАВ стрептомицетов. В: Вісник Дніпропетровського університету, 2006, т. 1, nr 14, с. 58-63.

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

42. Жукова Р.А. и др. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов. Ленинград: Медицина, 1978, 160 с.
43. Зарайская И.Ю. Системный анализ оборонительного поведения крыс Вистар при обучении двустороннему избеганию. В: Журнал ВНД, 1995, т. 45, nr 3, с. 472-478.
44. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. Москва: ГЕОС, 2001. 256 с.
45. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты. Москва: Изд-во МГУ, 1992. 87 с.
46. Зуев Н.П. и др. Изучение химиотерапевтического действия тилозина тартрата и фразидизина-40 (50). В: Вестник КГСХА, 2014, nr 2, с. 1-2.
47. Зуев Н.П., Зуева Е.Н. Применение тилозинсодержащих препаратов в пчеловодстве. В: Вестник АГАУ, 2012, т. 87, nr 1, с. 54-56.
48. Иутинская Г.А. Стратегия создания полифункциональных биопрепаратов нового поколения на основе метаболитов почвенных стрептомицетов. В: Биотехнология для сельского хозяйства и окружающей среды. Материалы XII Междунар. науч.-практ. конф. daRostim. Одесса, 2016, с. 103-104.
49. Кейтс Е.М. Техника липидологии. Москва: Мир, 1985. 304 с.
50. Клетикова Л. Влияние кишечной микрофлоры на содержание триглицеридов и холестерина в крови цыплят и кур. В: Птицеводство, 2012, nr 2, с. 37-39.
51. Ковальчук Л.П., Донец А.Т., Бурцева С.А. Липиды актиномицетов. Кишинев: Штиинца, 1979. 104 с.
52. Козаренко Т.Д., Зуев С.Н., Муляр Н.Ф. Ионообменная хроматография аминокислот (теоретические основы и практика). Новосибирск: Наука, 1981. 157 с.
53. Корнеев Н.Я. Повышение эффективности производства говядины и улучшение ее качества при использовании новых антистрессовых препаратов. Автореф. дисс. канд. с.-х. наук. Волгоград, 2007. 26 с.
54. Красильников Н.А. Лучистые грибки. Москва: Наука, 1970. 536 с.
55. Красочко П. А. и др. Влияние пробиотического препарата «Бацинил» на иммунную систему телят при терапии респираторных заболеваний. В: Ветеринарный врач, 2011, nr 4, с. 15-19.
56. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Ленинград: Наука, 1981, 339 с.
57. Курбанова М.Г., Тюнина Н.А. Производство аминокислот – передовая отрасль биотехнологии. В: Ресурсосберегающие технологии в сельском хозяйстве Западной Сибири. Материалы Междунар. науч.-практ. конф. Кемерово, 2009, с. 196-199.
58. Куценко А.С. Основы токсикологии. Санкт-Петербург: Фолиант, 2004. 720 с.

59. Лисов А.В. и др. Рекомбинантная ксиланаза *Streptomyces coelicolor* Ac-738: характеристика и эффективность воздействия на ксилан-содержащее сырье. В: Микробные биотехнологии. Материалы IX Междунар. конф. Минск, 2015, с. 95-96.
60. Маланин Л.П., Морозов А.П., Селиванова А.С. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве. Ветеринарные препараты. Москва: Агропромиздат, 1988. 319 с.
61. Мерзаева О.В., Широких И.Г. Образование ауксинов эндофитными актинобактериями озимой ржи. В: Прикладная биохимия и микробиология, 2010, т. 46, nr 1, с. 51-57.
62. Методы общей бактериологии: Под ред. Ф. Герхардта и др. Москва: Мир, 1984. 472 с.
63. Минушкин О.Н. и др. Дисбактериоз кишечника. В: Русский медицинский журнал, 1999, nr 3, с. 40-45.
64. Мирзаев М. Н. и др. Липиды *Streptomyces avemyces*: возможность применения в ветеринарной медицине. В: Биотехнология, 2004, nr 3, с. 75-77.
65. Музафаров А.М., Таубаев Т.Т. Культивирование и применение микроводорослей. Ташкент: Фан, 1984. 132 с.
66. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск: Наука, 1983. 233 с.
67. Покровский В.И. Медицинская микробиология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 768 с.
68. Полетаев А.Ю. и др. Оптимизация параметров выращивания продуцента кератиназы *Streptomyces ornatus* S1220. В: Техника пищевых производств, 2011, nr 2, с.3.
69. Постолакий О.М., Братухина А.А., Бурцева С.А. Липидный состав биомассы стрептомицетов после воздействия электромагнитного излучения миллиметрового диапазона. В: Электронная обработка материалов, 2015, т. 51, nr 4, с. 84-89.
70. 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.
71. Прокофьева-Бельговская А.Н. Строение и развитие актиномицетов. Москва: Изд-во АН СССР, 1963. 276 с.
72. Пронь О.И. и др. Стимуляторы роста при откорме свиней. В: Ветеринария, 2008. <http://www.rusnauka.com/Veterenaria/doc.htm> (посетила 14.03.2017).
73. Ракова Т.Н. Экспериментальное обоснование и практический аспект нового направления использования культур стрептомицетов в ветеринарии. Автореф. дисс. докт. вет. наук. Воронеж, 1989. 46 с.

74. Ранделин Д.А. Научно-практическое обоснование производства конкурентоспособной говядины на основе оптимизации использования породных ресурсов мясного скота. Автореф. дисс. докт. биол. наук. Волгоград, 2013. 49 с.
75. Редькина А.В. Роль ГАМК- и NMDA-рецепторов мозга крыс в модуляции латентного торможения: значение эмоционального и генетического факторов. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Томск, 2014. 19 с.
76. Рудик В.Ф. Биотехнологические основы получения биомассы микроводорослей и перспективы ее применения. Автореф. дис. докт. биол. наук. Москва, 1990. 36 с.
77. Рычкова С.С., Широких И.Г. Биосинтетическая активность изолятов стрептомицетов из бурой лесной почвы восточного побережья Эгейского моря. В: Экология родного края: проблемы и пути решения. Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием. Киров, 2016, с. 167-169.
78. Сеин О.Б., Трубников Д.В. Нанокapsулированные пробиотики: практические аспекты применения в животноводстве. В: Вестник КГСХА, 2013, № 3, с. 57- 59.
79. Селле П., Анчиков Э. Новый взгляд на применение фитазы в рационах бройлеров. В: Комбикорма, 2010, № 3, с. 81-82.
80. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Москва: Агропромиздат, 1990. 240 с.
81. Сеницкая Н.А., Огородникова Т.Е., Михайлова Н.П. Микробиологический синтез стерина. В: Прикладная биохимия и микробиология, 1993, т. 29, № 5, с. 675-683.
82. Соболевская М.П. и др. Актиномицеты озера Байкал как перспективные источники БАВ. В: Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии. Тезисы докладов региональной научной конференции. Владивосток, 2004, с.11.
83. Соколова Л.Ф. Эффективность использования обменной энергии у молодняка свиней при скармливании кормогризна. Автореф. дисс. канд. с.-х. н. Брянск, 1996. 25 с.
84. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Под редакцией М.О. Биргер. Москва: Медицина, 1982. 312 с.
85. Тодосійчук Т.С. та ін. Альтернативні компоненти поживних середовищ для актиноміцетів – продуцентів БАВ. В: Наукові вісті НТУУ "КПІ", 2012, № 3, с.74-79.
86. Физиология адаптационных процессов. Москва: Наука, 1986. 635 с.
87. Фисинин В.И. и др. Стрессы и стрессовая чувствительность кур в мясном птицеводстве. Диагностика и профилактика. Троицк: УГАВМ, 2013. 215 с.

88. Фурдуй Ф.И. и др. Предпосылки и основные положения санокреатологической теории питания человека. II. Постулаты санокреатологической теории питания. În: Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii, 2011, nr 1, p. 4-14.
89. Фурдуй Ф.И. Проблемы стресса и преждевременной биологической деградации человека. Санокреатология. Их настоящее и будущее. В: Современные проблемы физиологии и санокреатологии: Сборник науч. трудов, посвященный академику Ф.И. Фурдуй в связи с 70-летием со дня рождения. Кишинев, 2005, с. 16-36.
90. Хоулт Д. и др. Определитель бактерий Берджи. IX Издание. Москва: Мир, 1997. 954 с.
91. Шамханов Ч.Ю., Антипова Л.В. Физико-химические свойства комплексного препарата кератинрасщепляющих протеаз актиномицета *Streptomyces fradiospiralis* ВКМ А-157. В: Известия ВУЗов. Пищевая технология, 2005, nr 2-3, с. 64-66.
92. Шарова Н.Ю. Микроингредиенты микробного происхождения для создания продуктов функционального назначения. В: Актуальные вопросы теории и практики современной биотехнологии. Материалы конф. Санкт-Петербург, 2015, с. 75-81.
93. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. Учебник. Москва: Высшая школа, 1998. 416 с.
94. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Москва: Грантъ, 1998. Т. 1, 287 с.
95. Шептицкий В.А., **Березюк Ю.Н.**, Бурцева С.А. Условно-рефлекторная деятельность белых крыс при длительном применении биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-As-11. În: Buletinul AŞM, Ştiinţele vieţii, 2017, nr 1 (331), p. 16-24.
96. Шептицкий В.А., Братухина А., Бурцева С.А. Условнорефлекторная деятельность белых крыс при длительном потреблении биопрепаратов на основе метаболитов *Streptomyces massasporeus*. În: Buletinul AŞM, Ştiinţele vieţii, 2007, nr 2, p. 7-12.
97. Шептицкий В.А., Братухина А.А. Влияние метаболитов *Streptomyces massasporeus* на динамику массы тела и всасывание пищевых веществ в тонкой кишке при хроническом стрессе. В: Вестник науки Приднестровья, 2011, nr 1, с. 91-99.
98. Школьников Е.Э. и др. Экобиотехнологические препараты для агропромышленного комплекса России. В: Вестник КТУ, 2014, т. 17, nr 13, с. 255-263.
99. Штина Э., Голлербах М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1976. 143 с.
100. Эзергайл К.В. Научное и практическое обоснование способов коррекции стрессов молодняка крупного рогатого скота. Автореф. дис. докт. биол. наук. Волгоград, 2002, 47 с.

În limba engleză

101. Adams D.G., Duggan P.S. Heterocyst and akinete differentiation in *Cyanobacteria*. In: New Phytologist, 1999, vol. 144, p. 3-33.
102. Aftabuddin S. et al. Use of *Streptomyces fradiae* and *Bacillus megaterium* as probiotics in the experimental culture of tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Penaeidae). In: AACL Bioflux, 2013, vol. 6, p. 253-267.
103. Amato P. et al. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. In: FEMS Microbiology Ecology, 2007, vol. 59, p. 242-254.
104. Arai M.A., Koryudzu K., Ishibashi M. Inubosins A, B, and C are acridine alkaloids isolated from a culture of *Streptomyces sp.* IFM 11440 with Ngn2 promoter activity. In: Journal of Natural Products, 2015, vol. 78, nr. 2, p. 311-314.
105. Baltz R.H. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces*. In: Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2016, vol. 43, p. 343-370.
106. Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. In: Journal of Antibiotics, 2005, vol. 58, p. 1-26.
107. **Bereziuk Y.** Antimicrobial characteristics of *Streptomyces fradiae* 19 isolated from chernozem soil of the central part of the Republic of Moldova. In: Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie, 2016, tom XXIII, is. 2, p. 56-61.
108. **Bereziuk Y.** et al. 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 cyanobacterial nature. In: Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie, 2017, tom XXIV, is. 2, p.60-65.
109. **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.
110. **Bereziuk Y.** et al. 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.
111. Book A.J. et al. Cellulolytic *Streptomyces* strains associated with herbivorous insects share a phylogenetically linked capacity to degrade lignocellulose. In: Applied and Environmental Microbiology, 2014, vol. 80(15), p. 4692-4701.
112. Boortseva S., **Bereziuk Y.** 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, is. 2, p. 57-62.

113. Boukhris I. et al. Evidence for the negative regulation of phytase gene expression in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*. In: Journal of Basic Microbiology, 2016, vol. 56, p. 59-66.
114. Brana A. F. et al. Two *Streptomyces* species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and coral reef invertebrates from the Cantabrian Sea. In: Microbial Ecology, 2015, vol. 69, p. 512–524.
115. Brandt L.J. Intestinal Microbiota and the Role of Fecal Microbiota Transplant in Treatment of *C. difficile* Infection. In: American Journal Gastroenterology, 2013, nr 108, p. 177-185.
116. Bremner J.D. Does stress damage the brain? In: Biological Psychiatry, 1999, vol. 45, p. 797-805.
117. Cha J.W. et al. Pontemazines A and B, phenazine derivatives containing a methylamine linkage from *Streptomyces* sp. UT1123 and their protective effect to HT-22 neuronal cells. In: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2015, vol. 25, nr 22, p.5083-5086.
118. Chandra G., Chater K.F. Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of actinobacterial genome sequences. In: FEMS Microbiological Reviews, 2014, nr 38, p. 345-379.
119. Chater K.F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. In: FEMS Microbiological Reviews, 2010, nr 34, p. 171–198.
120. Chaudhary A.K. et al. An Insight into the “-Omics” Based Engineering of *Streptomyces* for Secondary Metabolite Overproduction. In: BioMed Research, vol. 2013, p.1-15.
121. Chen D. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* hsryfm 1301 on the intestinal microbiota of hyperlipidemic model. In: BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, nr 14, p. 386.
122. Chen Y. et al. Growth Promotion and Disease Suppression Ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from Banana Rhizosphere Soil. In: Frontiers in Microbiology, 2018, vol. 8, 18 p.
123. Cho J.J. et al. Manumycin A from a new *Streptomyces* strain induces endoplasmic reticulum stress-mediated cell death through specificity protein 1 signaling in human oral squamous cell carcinoma. In: International Journal of Oncology, 2015, nr 47(5), p. 1954-1962.
124. Choi D. et al. Tylosin production by *Streptomyces fradiae* using raw cornmeal in airlift bioreactor. In: Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, vol. 17(7), p. 1071-1078.
125. Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism. In: Microbiological Reviews, 1983, nr 47, p. 551– 558.
126. Collins M., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of gut. In: American Journal of Clinical Nutrition, 1999, vol. 69, nr 5, p. 1052–1057.

127. Comprehensive Molecular Insect Science. Cambridge, 2005. 3300 p.
128. Cummins C., Harris H. Studies on the Cell-Wall Composition and Taxonomy of *Actinomycetales* and Related Groups. In: Journal of General Microbiology, 1958, nr 18, p. 173-189.
129. Das S., Ward L. R., Burke C. Screening of marine *Streptomyces spp.* for potential use as probiotics in aquaculture. In: Aquaculture, 2010, vol. 305, p. 32–41.
130. Deepika T.L., Kannabiran K. A report on antidermatophytic activity of actinomycetes isolated from Ennore coast of Chennai, India. In: International Journal of Integrative Biology, 2009, nr 6(3), p.132-136.
131. Demain A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. In: Biotechnology Advances, 2000, nr 18, p. 499–514.
132. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. In: Journal of Antibiotics, 2009, nr 62(1), p. 5-16.
133. Dey P., Harborne J. Methods in Plant Biochemistry. Carbohydrates. Academic Press, 1993. Vol. 2, 529 p.
134. Dharmaraj S., Ashokkumar B., Dhevendaran K. Fermentative production of carotenoids from marine actinomycetes. In: Iranian Journal of Microbiology, 2009, vol. 1(4); p. 36-41.
135. Dharmaraj S., Dhevendaran K. Evaluation of *Streptomyces* as a probiotic feed for the growth of ornamental fish *Xiphophorus helleri*. In: Food Technology and Biotechnology, 2010, vol. 48, p. 497–504.
136. El-Naggar N., Deraz S. et al. Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82. In: Scientific Reports, 2016, nr 6, p. 1-16.
137. El-Naggar N., El-Ewasy S. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. In: Scientific Reports, 2017, nr 7, p. 1-19.
138. El-Naggar N., Moawad H. *Streptomyces brollosae sp. nov.*, NEAE-115, a novel L-asparaginase producing actinomycete isolated from Brollos Lake at the Mediterranean coast of Egypt. In: Journal of Pure and Applied Microbiology, 2015, nr 9, p. 11–20.
139. Ezra D. et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces sp.* (MSU-2110) endophytic on *Monstera sp.* In: Microbiology, 2004, nr 150, p. 785–793.
140. Fedoryshyn M. et al. Surprising production of a new urdamycin derivative by *Streptomyces fradiae* ΔurdQ/R. In: Journal of Biotechnology, 2007, vol. 130(1), p. 32-38.

141. Fukuda D.S. et al. A54145, a new lipopeptide antibiotic complex: isolation and characterization. In: Journal of Antibiotics (Tokyo), 1990, vol. 43(6), p. 594-600.
142. Furumai T. et al. TPU-0037-A, B, C and D, novel lydicamycin congeners with anti-MRSA activity from *S.platensis* TP-A0598. In: Journal of Antibiotics, 2002, vol. 55, p. 873-880.
143. Gómez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. In: Nature Reviews Neuroscience, 2008, vol. 9, nr 7, p. 568-578.
144. Gopikrishnan V. et al. Antibiofouling potential of quercetin compound from marine-derived actinobacterium, *Streptomyces fradiae* PE7 and its characterization. In: Environmental Science and Pollution Research, 2016, vol. 23(14), p. 13832-13842.
145. Guinane C.M., Cotter P.D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. In: Therapeutic Advances in Gastroenterology, 2013, nr 6, p. 295-308.
146. Habrda J. et al. The quality of meat from pigs fed a diet supplemented with the biostimulator, Vitamycin. In: Veterinary Medicine, 1980, vol. 25, p. 449-485.
147. Hara M. Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. In: Proceedings of National Academy of Sciences. USA, 1993, nr 90, p.2281-2285.
148. Hasani A. et al. *Streptomyces*: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. In: International Journal of Advanced Biological & Biomedical Research, 2014, v. 2, p. 63-75.
149. Holman D.B., Chénier M.R. Impact of subtherapeutic administration of tylosin and chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine. In: FEMS Microbiology Ecology, 2013, nr 85(1), p. 1-13.
150. Hopwood D. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. In: Microbiology, 1999, nr 145, p. 2183–2202.
151. Hopwood D. Streptomyces in nature and medicine. The Antibiotic Makers. New York: Oxford University Press, 2007. 250 p.
152. Hosseini S. V. et al. Kinetics of alkaline protease production by *Streptomyces griseoflavus* PTCC1130. In: Iranian Journal of Microbiology, 2016, vol. 8, nr 1, p. 8-13.
153. Jang J.P. et al. Anti-angiogenesis effects induced by octaminomycins A and B against HUVECs. In: Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, vol. 28(8), p. 1332-1338.
154. Jeon S.G. et al. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. In: PLoS Pathogens, 2012, vol. 8, is. 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002714>
155. Kabaluk J. T. et al. The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdiction worldwide. China, Hong Kong: IOBC Global, 2010. 99p.

156. Kaji A. et al. Alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces massasporeus* Ifo 3841. In: Technical bulletin of Faculty of Agriculture, 1982, vol. 34, is. 1, p. 79-85.
157. Kaushik P., Chauhan A. *Cyanobacteria: Antibacterial Activity*. New India Publishing Agency, 2009. 198 p.
158. Khaliq S. et al. Production of tylosin in solid-state fermentation by *Streptomyces fradiae* NRRL-2702 and its gamma-1 mutant. In: Letters in Applied Microbiology, 2009, nr 49, p. 635-640.
159. Kim J. et al. Effects of the Antibiotics Growth Promoter Tylosin on Swine Gut Microbiota. In: Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, nr 26(5), p. 876–882.
160. Kim K.H. et al. Manumycin A induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma through regulation of Sp1 and activation of the mitochondria-related apoptotic pathway. In: Oncology Reports, 2016, nr 36(1), p.117-124.
161. Kim W.G. et al. Benzastatins H and I, new benzastatin derivatives with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitrosporeus*. In: Journal of Antibiotics, 2001, vol. 54, p. 513-516.
162. le Roes-Hill M. et al. *Streptomyces swartbergensis* sp. nov., a tyrosinase and antibiotic producing actinobacterium. In: Antonie Van Leeuwenhoek, 2018, vol. 111(4), p. 589-600.
163. Leirós M. et al. The *Streptomyces* metabolite anhydroexfoliamycin ameliorates hallmarks of Alzheimer's disease in vitro and in vivo. In: Neuroscience, 2015, vol. 305, p. 26-35.
164. Li F. et al. Anti-Influenza A Viral Butenolide from *Streptomyces* sp. Smu03 Inhabiting the Intestine of *Elephas maximus*. In: Viruses, 2018, vol. 10(7), <https://doi.org/10.3390/v10070356>.
165. Li N. et al. Cloning and characterization of protease-resistant xylanase from *Streptomyces fradiae* var. k11. In: Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, vol. 18(3), p. 410-416.
166. Liutskanova D.G. et al. Increase in tylosin production by a commercial strain of *S. fradiae*. In: Applied Biochemistry and Microbiology, 2005, vol. 41, nr 2, p. 165-168.
167. Lu Y. et al. Characterization and identification of a novel marine *Streptomyces* sp. produced antibacterial substance. In: Marine Biotechnology, 2009, nr 11, p. 717-724.
168. Machado I., Teixeira J. A., Rodríguez-Couto S. Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. In: Journal of Biotechnology, 2013, vol. 165(3–4), p. 195-200.
169. Manivasagan P., Oh J. Production of a novel fucoidanase for the green synthesis of gold nanoparticles by *Streptomyces* sp. and its cytotoxic effect on HeLa cells. In: Marine Drugs, 2015, vol. 13, p. 6818-6837.

170. Martin G. et al. Marmycins A and B, Cytotoxic C-Glycosides from a Marine Sediment-Derived *Streptomyces*. In: Journal of Natural Products, 2007, vol. 70, p.1406-1409.
171. Mohanraj G., Sekar T. Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. In: International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research, 2013, nr 2(3), p.115-126.
172. Naidu P.V.S. et al. Characterization and biological activities of quercetin thiosemicarbazone derivatives: potential anticancer drugs. In: International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Science, 2012, vol. 3 (2), p. 24-27.
173. Ndonde M.J.M., Semu E. Preliminary characterization of some *Streptomyces spp.* from Tanzanian soils and their antimicrobial potential against selected plant and animal pathogenic bacteria. In: World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, vol. 16(7), p. 595-599.
174. Nedialkova D., Naidenova M. Screening the Antimicrobial activity of Actinomycetes strains isolated from Antarctica. In: Journal of Culture Collections, 2004, vol. 4, p. 29-35.
175. Palmer T., Hutchings M. Protein Secretion in *Streptomyces*. In: Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology, 2011, vol. 4, p. 87-104.
176. Patent US 2988487. Process of treating keratinaceous material and a keratinase produced thereby. Nickerson W.J., Princeton, Novel J.J. Public. 13.06.1961.
177. Pluschkell U., Horowitz A. R., Ishaaya I. Effect of milbemectin on the sweetpotato whitefly. In: Phytoparasitica, 1999, vol. 27, p. 183-191.
178. Prieto-Davó A. et al. The Madeira – a Significant Source of Marine-Derived Actinomycete Diversity with Antimicrobial Potential. In: Frontiers in Microbiology, 2016, vol. 7, 12 p.
179. Qiu P. et al. Diversity, bioactivities and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Sichuan, China. In: Journal of Natural Medicines, 2015, nr 13(12), p. 942-953.
180. Radi E. et al. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. In: Journal of Alzheimer's Disease, 2014, nr 42, suppl. 3, p. 125-152.
181. Rashada F. M. et al. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. In: Microbiological Research, 2015, nr 175, p. 34–47.
182. Ratiiner L.M., Davis M., Ressler K.I. Brain-derived neurotrophic factor in amygdaladependent learning. In: Neuroscientist, 2005, vol. 11. p. 323-333.
183. Reda F.M. Kinetic properties of *Streptomyces canaries* L-Glutaminase and its anticancer efficiency. In: Brazilian Journal of Microbiology, 2015, vol. 46, is. 4, p. 957-968.

184. Rizk M. et al. Screening of antagonistic activity in different *Streptomyces spp.* against pathogenic microorganisms. In: Journal of Biological Sciences, 2007, vol. 7, p. 1418-1423.
185. Rudolf J.D., Dong L.-B., Shen B. Platensimycin and Platencin: inspirations for chemistry, biology and medicine. In: Biochemical Pharmacology, 2017, vol. 133, p. 139–151.
186. Saadoun I. et al. Diversity of soil streptomycetes in Jordan. In: Actinomycetes, 1998, nr 9, p.53-58.
187. Sacramento D.R. et al. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces sp.*) isolated from a Brazilian tropical forest soil. In: World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, vol. 20(3), p. 225-229.
188. Samri S.E. et al. Insecticidal activity of a Moroccan strain of *Streptomyces phaeochromogenes* LD-37 on larvae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. In: Bulletin of entomological research, 2017, vol. 107(2), p. 217-224.
189. Santos A.P.P. et al. Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces sp.* DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. In: Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2017, vol.51 nr 2. 10 p. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20176657>
190. Sarmiento-Vizcaino A. et al. Atmospheric Precipitations, Hailstone and Rainwater, as a Novel Source of *Streptomyces* Producing Bioactive Natural Products. In: Frontiers in Microbiology, 2018, 15 p. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00773>.
191. Ser H. et al. *Streptomyces antioxidans* sp. nov., Novel Mangrove Soil Actinobacterium with Antioxidative Potentials. In: Frontiers in Microbiology, 2016, nr 7, p. 899.
192. Siddique S. et al. Production of avermectin B1b from *Streptomyces avermitilis* 41445 by batch submerged fermentation. In: Jundishapur Journal of Microbiology, 2013, vol. 6, 6 p.
193. Singh N., Rai V., Tripathi C.K.M. Purification and chemical characterization of antimicrobial compounds from a new soil isolate *Streptomyces rimosus* MTCC 10792. In: Applied biochemistry and microbiology, 2013, nr 5, p. 467-475.
194. Sohler A. et al. Cell wall composition and the action of lysozyme upon cells and cell walls of the Actinomycetales. In: Journal of Bacteriology, 1958, vol. 72, p.283-290.
195. Souagui Y. et al. Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces sp.* SY-BS5 using response surface methodology. In: Journal of Medical Mycology, 2015, vol. 25(2), p. 108-115.
196. Spinosa H.S., Gerenutti M., Bernardi M.M. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistic evaluations. In: Comparative Biochemistry and Physiology, 2000, vol. 127, nr 3, p. 359-366.

197. Sujatha P. et al. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In: Microbiological Research, 2005, nr 160 (2), p. 119-126.
198. Sunazuka T., Hirose T., Omura S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. In: Accounts of Chemical Research, 2008, vol. 41, p. 302-314.
199. Takehana Y. et al. Frdiamine A, a new siderophore from the deep-sea actinomycete *Streptomyces fradiae* MM456M-mF7. In: Journal of Antibiotics, 2017, nr 70, p. 611-615.
200. Tan L.T. et al. Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *Streptomyces sp.* MUM256 isolated from Malaysia soil. In: Frontiers in Microbiology, 2015, v. 26, p.13-16.
201. Tan L.T. et al. *Streptomyces sp.* MUM212 as source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. In: Frontiers in Pharmacology, 2017, v. 8, 18 p.
202. Tatsuro Y. Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct Actinomycetes. In: Journal of Bacteriology, 1965, vol. 89, nr 2, p. 444-453.
203. Thoden J.B., Holden H.M. Production of a novel N-monomethylated dideoxysugar. In: Biochemistry, 2014, vol. 53(7), p. 1105-1107.
204. Tiwari K., Gupta R.K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. In: Critical Reviews in Biotechnology, 2012, nr 32, p. 108-132
205. Vastrad B.M., Neelagund S.E. Optimization of medium composition for the production of neomycin by *Streptomyces fradiae* NCIM 2418. In: Biotechnology Research International, 2014, vol. 2014, 11 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/674286>
206. Wang Y. et al. Phenolic Polyketides from the Cultivation of Marine-Derived *Penicillium sp.* WC-29-5 and *Streptomyces fradiae* 007. In: Marine Drugs, 2014, vol. 12, p. 2079-2088.
207. Wang X. et al. Terfestatins B and C, new p-terphenyl glycosides produced by *Streptomyces sp.* RM-5-8. In: Organic Letters, 2015, vol. 17, is. 11, p. 2796-2799.
208. Wu B. et al. A new aminopeptidase from the keratin-degrading strain *Streptomyces fradiae* var. k11. In: Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, v. 160, nr 3, p. 730-739.
209. Xin W. et al. New Capoamycin-Type Antibiotics and Polyene Acids from Marine *Streptomyces fradiae* PTZ0025. In: Marine Drugs, 2012, nr 10(11), p. 2388-2402.
210. Zhang H. et al. Bacterial hosts for natural product production. In: Molecular Pharmaceutics, 2008, nr 5, p. 212-225.
211. Zhu C. et al. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effects of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate. In: Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, nr 73, p.1031-1038.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

Морфо-культуральные свойства штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11

Диаметр колоний, мм		Цвет воздушного мицелия	Цвет субстратного мицелия	Описание колоний	Активность роста	Соотношение колоний, %
СРЕДА ЧАПЕКА						
7 дней	0,8	Белый–у маленьких колоний, у больших: края – белый, центр – слабо-опушенный, зеленовато-серый	Мраморно-розовый	Ф – неправильная; Пр – выпуклый; Кр – лопастной; Пв – шероховатая; К – кожистая, порошкообразная, отсутствие блеска.	++	100
14 дней	3,0					
21 день	3,0					
СРЕДА ГАУЗЕ						
7 дней	0,8-2,5	Мелово-белый. Центр – мелово-белый, края – белый.	Диффузия в агар-агар – отсутствует, цвет – шамау, шерсти серны	Ф – круглая; Пр – каплевидный; Кр – гладкий, Пв – морщинистая; С – однородная; К – кожистая; отсутствие блеска	+	100
14 дней	3,0-4,0					
21 день	4,0-5,5					
ОВСЯНЫЙ АГАР						
7 дней	1,5-4,0	Мелово-белый. Центр – мелово-белый, края – белый.	Желтоватый	Ф – круглая с фестончатыми краями; Пр – каплевидный; Кр – гладкий; С – мелкозернистая; Пв – шероховатая; К – кожистая, порошкообразная; отсутствие блеска, присутствие экссудата на поверхности колоний.	+++	100
14 дней	1,5-8,0					
21 день	4,0-11,0					
СРЕДА SR-I						
7 дней	0,8-2,5	Мелово-белый	Желтовато-буроватый	Ф – круглая с ризоидным краем; Пр – выпуклый; Кр – реснитчатый; С – однородная.	+++	100
14 дней	3,0-4,0					
21 день	3,5-5,0					
СРЕДА ПРИДХЕМА-ГОТТЛИБА						
7 дней	0,8-2,0	Мелово-белый	Кожано-бурый, диффузии в агар-агар нет	Ф – круглая с валиком по краю; Пр – каплевидный; Кр – гладкий; С – однородная; Пв – шероховатая; К – кожистая; отсутствие блеска.	++	100
14 дней	0,8-3,5					
21 день	1,0-3,5					

Примечание: Ф – форма, Пр – профиль, Пв – поверхность, Кр – край, С – структура; К – консистенция; + – очень слабый рост, ++ – слабый рост, +++ – хороший рост, ++++ – очень хороший рост.

ИНСТИТУЦИЯ
ДЕ БИВЪЦЪМЫНТ ДЕ СТАТ
«УНИВЕРСИТАТЯ ДЕ СТАТ
НИСТРЯНЭ Т.Г. ШЕВЧЕНКО»



ДЕРЖАВНИЙ
ОСВІТНІЙ ЗАКЛАД
«ПРИДНІСТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. Т.Г. ШЕВЧЕНКА»

ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Т.Г. ШЕВЧЕНКО»

АКТ

07.12.2017 № 9

В специализированный ученый совет
по защите докторских диссертаций
при Институте микробиологии
и биотехнологии
Академии наук Молдовы

о внедрении результатов исследований Юлии Николаевны Березюк, включенных в материалы диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук на тему: "Влияние биопрепаратов на основе стрептомицетов на состав кишечной микрофлоры и адаптивные возможности теплокровных животных".

Настоящим подтверждается, что результаты исследований Березюк Ю.Н. включены в курсы лекций дисциплин «Физиология пищеварения», «Физиология человека и животных» и «Высшая нервная деятельность», которые читаются на кафедре физиологии и санокреатологии естественно-географического факультета Приднестровского государственного университета им. Т.Г. Шевченко.

Декан естественно-географического
факультета ПГУ им. Т.Г. Шевченко
к.б.н., доцент




С.И. Филипенко

11020



INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M.
COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE
str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbcnmn@yahoo.com

ADEVERINȚĂ DE DEPOZITARE

Burțeva Svetlana, Bereziuc Iulia

(numele, prenumele deponentului)

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al A.Ș.M.

(denumirea organizației)

str. Academiei 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova

(adresa deponentului)

Streptomyces fradiae (Waksman et Curtis 1916;
Waksman et Henrici 1948)

producător de exometaboliți pentru
agricultură, zootehnie, veterinărie

(Genul, specia și destinația tulpinii)

Numărul de înregistrare, invocat tulpinii
depozitate de către Colecție:

Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11

Data depozitării: 27.10.2016

Adresa și denumirea colecției:

str. Academiei 1, MD-2028, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie,
Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN),
Chișinău, Republica Moldova
Tel.: (+373 22) 73 96 09
E-mail: imbcnmn@yahoo.com
Web: www.imb.asm.md

Directorul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie,
academician, profesor universitar

V. Rudic

Șef al CNMN, doctor în biologie, conferențiar cercetător

O. Chiselița



Приложение 4.
Акт №105 от 05.12.2017 об использовании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, в исследованиях Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии

CNMN INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE
ȘI BIOTEHNOLOGIE AL A.Ș.M.
COLECȚIA NAȚIONALĂ DE MICROORGANISME NEPATOGENE
str. Academiei, 1, MD-2028, Chișinău, Republica Moldova, Tel. (373 22) 73 96 09, e-mail: imbcnmn@yahoo.com

Nr. 105
Din 05.12 2017

ACT

Prin prezentul, se confirmă, că tulpina *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 - producător de exometaboliți pentru agricultură, zootehnie și veterinarie, depozitată în CNMN la data de 27.10.2016, autori Burțeva Svetlana, Bereziuc Iulia, este utilizată în cercetări în cadrul proiectului Instituțional, executor Colecția Națională de Microorganisme Nепatogene.

Vicedirector științific al IMB al AȘM,
dr. în biol., conf. cercet.



Cepoi Liliana

Șef CNMN al IMB al AȘM,
dr. în biol., conf. cercet.

Chiselița Oleg



MD 1180 Y 2017.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1180** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61K 35/74* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2017 0030
(22) Data depozit: 2017.03.02

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2017.08.31, BOPI nr. 8/2017

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: ȘEPTIȚCHI Vladimir, MD; BEREZIUC Iulia, MD; BURȚEVA Svetlana, MD

(73) Titular: INSTITUTUL DE FIZIOLOGIE ȘI SANOCREATOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(54) **Procedeu de stimulare a formării reflexelor condiționate în perioada
diminuării funcțiilor**

(57) Rezumat:

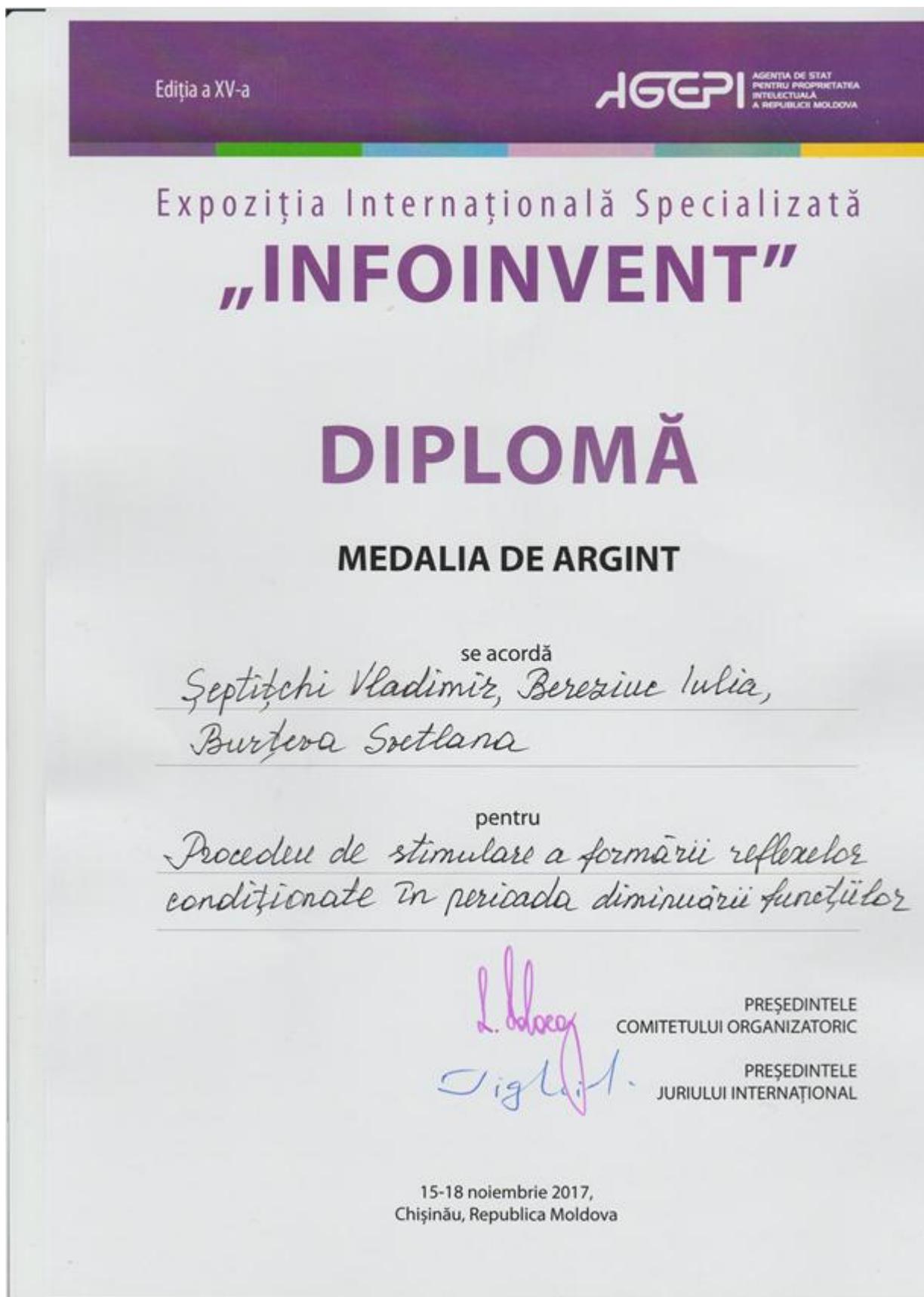
1
Invenția se referă la fiziologia experimentală, medicina experimentală și farmacologie, în special la procedee de stimulare a formării reflexelor condiționate în perioada diminuării funcțiilor.

Conform invenției, procedeul include administrarea în calitate de aditiv alimentar a

2
metaboliților biomasei tulpinii de *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, în doză de 250 mg/kg masă corporală pe zi, timp de 90 zile până la formarea și în perioada de formare a reflexelor condiționate.

Revendicări: 1

MD 1180 Y 2017.08.31



Декларация об ответственности

Нижеподписавшаяся, Березюк Юлия, заявляю под личную ответственность, что материалы, представленные в докторской диссертации, являются результатом личных научных исследований и разработок. Осознаю, что, в противном случае, буду нести ответственность в соответствии с действующим законодательством.

Березюк Юлия

CV АВТОРА

Фамилия, имя:

Березюк Юлия

Дата и место рождения:

5 апреля 1979 г.,

г. Одесса, Украина

Гражданство:

Республика Молдова

**Образование:**

1997-2003 – Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко, медицинский факультет, специальность «Лечебное дело»

2014-2017 – Университет Академии Наук Молдовы, докторант по специальности «Микробиология»

Область научных интересов:

- микробиология;
- физиология;
- направленный синтез биоактивных веществ стрептомицетами;
- исследование влияния биоактивных веществ стрептомицетов на морфологические, функциональные и репродуктивные показатели организма при стрессе и в обычных физиологических условиях.

Профессиональная деятельность:

2003-2004 – ГУ РКБ (г. Тирасполь), врач-интерн

2004-2005– ГУ ТКЦАПП (г. Тирасполь), врач-терапевт

2005 – настоящее время – Приднестровский государственный университет, преподаватель

Участие в научных конференциях:

Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014), 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015 г.), XI Международная практическая конференция daRostim 2015. «Теория, практика и перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве» (Сыктывкар, 2015), III Международный микологический форум (Москва, 2015), Annual International, Conference on Research, Education and Teaching by Russian Academics (Athenes, 2016), XII-th International Scientific and Practical Conference

«daRostim 2016»: Biotechnology for agriculture and environmental protection (Odessa, 2016), International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 3rd edition, dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and the 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova (Кишинев, 2016), международная научно-практическая конференция «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Винница, 2016), международная конференция «Современные аспекты сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева, 2016), XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2016), конференция „Integrare prin cercetare și inovare” (Кишинев, 2016), IV международный медико-фармацевтический конгресс студентов и молодых ученых «Інновації та перспективи сучасної медицини» ВІМСО 2017 (Черновцы, 2017), Четвертый Съезд Микологов России (Москва, 2017), Международная Научная Конференция Докторантов «Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători» (Кишинев, 2015-2017).

Научные публикации:

Опубликовано – **27** работ, из которых:

- статьи в рецензируемых научных журналах – **6** (включая **2** без соавторов);
- статьи в национальных и международных сборниках – **11** (включая **1** без соавторов);
- тезисы научных форумов – **8** (включая **3** без соавторов);
- патенты на изобретение и материалы выставок изобретений – **2**.

Премии и награды:

- ✓ Грамота Оргкомитета IV Международного медико-фармацевтического конгресса студентов и молодых ученых «Инновации и перспективы современной медицины» ВІМСО 2017 за оригинальное научное исследование (Черновцы, 2017),
- ✓ Серебряная медаль на Международной Специализированной Выставке «INFOINVENT», 2017.

Контактная информация:

MD – 3300, г. Тирасполь, ул. Мира, 33

Телефон: +373 79 174053,

e-mail: ulia2032@gmail.com