

*На правах рукописи*



**УРЯДОВА Галина Тимофеевна**

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ  
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Саратов – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Карпунина Лидия Владимировна**

**Официальные оппоненты:** **Лысенко Юрий Андреевич**,  
доктор биологических наук, доцент,  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
аграрный университет имени  
И.Т. Трубилина»,  
профессор кафедры биотехнологии,  
биохимии и биофизики

**Федоненко Юлия Петровна**  
кандидат биологических наук, доцент,  
Институт биохимии и физиологии  
растений и микроорганизмов –  
обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Федерального  
исследовательского центра «Саратовский  
научный центр Российской академии наук»,  
заведующий лабораторией биохимии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Башкирский государственный  
аграрный университет»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК №3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и на сайте [www.sgau.ru](http://www.sgau.ru).

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ученому секретарю диссертационного совета 35.2.035.01.

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

В последние годы внимание исследователей все больше привлекают полисахариды (ПС) микробного происхождения, а среди них экзополисахариды (ЭПС) бактерий, в связи с возможностью их применения в пищевой промышленности, фармацевтике, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве (Ермольева, Вайсберг, 1976; Ботвинко, 1985; Sandford, Cotterell, Pettitt, 1984; Degeest, 2001; Broadbent, 2003; Roca et al., 2015; Vasiliu, 2016). Преимущества таких ЭПС в их сезонной независимости, простоте и экономичности производства, регулировании свойств и условий их получения (Кочетков, 1994). В естественной среде обитания ЭПС бактерий обеспечивают защиту клеток от токсических воздействий окружающей среды, способствуют поглощению катионов, формируют биопленки, определяют антигенные свойства клетки (Cerning, Roissart, Luquet, 1994; Fernandes, 2010). Известно также, что ЭПС бактерий обладают антимикробными, иммуномодулирующими, ранозаживляющими свойствами (Мизина и др., 2000; Онищенко, Алешкин, Афанасьев, 2002; Правдивцева, 2012). Среди бактериальных полисахаридов значительное внимание уделяется ЭПС молочнокислых бактерий, обладающих международными статусами безопасности GRAS (Generally Recognized As Safe – общепризнанные в качестве безопасных) (FDA, 2018) и QPS (Qualified Presumption of Safety – имеющие квалифицированную презумпцию безопасности) (Barlow et al., 2007) и являющихся пробиотическими культурами. Имеются сведения в литературе о биологических свойствах и применении ЭПС молочнокислых бактерий (Доронин, Шендеров, 2002; Горельникова, Карпунина, 2015; Cerning, Roissart, Luquet, 1994; Kitazawa et al., 1998; Thapa, Hao, 2008; Oh, Lee, Paik, 2010; Yoshida et al., 2011; Puneeth Kumar, 2012; Nami et al., 2014; Vasiliu, 2016; Castro-Bravo et al., 2018, 2019 и др.), однако, в основном, эти работы посвящены ЭПС лактобацилл и бифидобактерий.

### Степень разработанности темы исследования

Известно, что в состав нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) помимо основных представителей молочнокислых бактерий – бифидобактерий и лактобактерий (Шендеров, 1998; Доронин, Шендеров, 2002; Данилевская, 2008; Симонова, Пономарева, 2008; Castro-Bravo et al., 2018), входят лактококки (Квасников, Нестеренко, 1975; Макарова, Намазова-Баранова, 2015; Corroller et al., 1998; Beasley, Saris, 2004; Nami et al., 2014) и стрептококки, составляющие малочисленную группу (Макарова, Намазова-Баранова, 2015; Ley et al., 2006). Имеются немногочисленные публикации относительно влияния ЭПС *Lactococcus lactis* и *Streptococcus thermophilus* на продукцию некоторых цитокинов макрофагами, скорость фагоцитоза, подавление роста опухолевых клеток у мышей (Kitazawa, 1991; Rodríguez et al., 2009; Mizuno et al., 2020). Однако эти работы не раскрывают в полной мере выполняемую ими роль в живом организме. Для обоснования применения экзополисахаридов молочнокислых кококов в медико-биологической практике, ветеринарии и других отраслях сельского хозяйства необходимы более обширные знания об их биологической активности. Поэтому исследования в этой области являются актуальными и имеют научное и практическое значение.

**Цель работы** состояла в изучении биологической активности и биотехнологических аспектов использования экзополисахаридов молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* B-1662 и *Streptococcus thermophilus*.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить общую токсичность экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на биотест-объектах *Colpoda steinii* и белых новозеландских кроликах.
2. Изучить антимикробную активность *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и их ЭПС в отношении некоторых представителей условно-патогенной микрофлоры (*Escherichia coli* 113-13 и АТСС 25922, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853 и АТ-31, *Staphylococcus aureus* 209-Р, *Klebsiella pneumoniae* К2, *Bacillus subtilis* 262, *Candida albicans* 223 и 13108).
3. Выявить влияние экзополисахарида *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на факторы естественной резистентности организма белых мышей: фагоцитарную активность макрофагов и продукцию провоспалительных цитокинов в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р.
4. Изучить влияние экзополисахарида *S. thermophilus* на организм (живую массу, биохимические и микробиологические показатели) ленского осетра (*Acipenser baerii stenorrhynchos Nikolsky*) при добавлении в корм, а также на органолептические показатели (вкуса и консистенции) рыбы.
5. Создать пленочные покрытия на основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, изучить их некоторые физические свойства (прочность, растяжимость, толщина, вязкость) и оценить их влияние на заживление ожогов у крыс.
6. Определить степень воздействия растворов ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и пленочных покрытий, созданных на их основе, на микрофлору ожогов и состав лейкоцитов крови при применении их в заживлении ожогов у крыс.

**Научная новизна.** Проведено исследование биологической активности экзополисахаридов молочнокислых бактерий *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*. На биотест-объектах *C. steinii* и белых новозеландских кроликах (кожная проба) показано отсутствие их токсичности в концентрации 0,06 г/л. Установлена способность данных полисахаридов *in vitro* подавлять рост *E. coli* 113-13 и АТСС 25922, *P. aeruginosa* АТСС 27853 и АТ-31, *S. aureus* 209-Р, а также ЭПС лактококка подавлять рост еще и *B. subtilis* 262, ЭПС стрептококка – *K. pneumoniae* К2. Изучаемые ЭПС способны стимулировать фагоцитарную активность макрофагов мышей и продукцию провоспалительного цитокина – интерлейкина-1 $\alpha$  (ИЛ-1 $\alpha$ ), но не влиять на синтез фактора некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ). Обнаружено, что добавление экзополисахарида *S. thermophilus* в корм ленского осетра способствует увеличению его массы и количества молочнокислых бактерий в кишечнике, не оказывая негативного влияния на биохимические показатели крови рыб. Созданы пленочные покрытия на основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и определены их некоторые физические свойства (прочность, растяжимость, толщина, вязкость). Впервые выявлена способность пленочных покрытий, созданных на основе ЭПС, ускорять заживление ожоговых ранений у крыс, с подавлением роста бактерий группы кишечной палочки и стафилококков, способствуя нормальному (не патологическому), течению данного процесса без осложнений.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные результаты расширяют представление о роли экзополисахаридов молочнокислых бактерий в живом организме и вносят существенный вклад в фундаментальные исследования экзополисахаридов микроорганизмов. Выявленная способность нетоксичных экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* подавлять рост некоторой условно-патогенной микрофлоры, регулировать активность факторов естественной резистентности, ускорять заживление ожоговых ранений, увеличивать ихтиомассу

ленского осетра, благотворно влияя на формирование кишечной микробиоты, улучшая органолептические показатели мяса рыбы. Это открывает перспективы их использования в экспериментальной биологии, медицинской, фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве. По материалам диссертационной работы опубликованы методические рекомендации: «Изучение влияния условий культивирования молочнокислых бактерий на их способность образовывать биопленки» (в соавторстве с А.Ю. Тяпкиным, Л.В. Карпуниной, Н.А. Фокиной, 2018); «Изучение влияния экзополисахаридов молочнокислых бактерий и пленочных покрытий, созданных на их основе, на заживление ранений лабораторных животных» (в соавторстве с Н.А. Фокиной, Л.В. Карпуниной, 2018); «Определение биологической активности экзополисахаридов молочнокислых бактерий *in vitro* и *in vivo*» (в соавторстве с Н.А. Фокиной, С.В. Савиной, Л.В. Карпуниной, 2018), рекомендованные на заседании кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова (протокол №16 от 28.04.2018 г.; протокол №8 от 04.02.2020 г.; протокол №8 от 04.02.2020 г. соответственно) для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, специалистов микробиологических, иммунологических и ветеринарных лабораторий. Предложенная технология выращивания рыб при кормлении их ЭПС *S. thermophilus* рекомендована к использованию в ООО «Рыбный дом» (акт о внедрении результатов №5 от 11.04.2022 г.) и ООО «Тёпловский рыбопитомник» (акт о внедрении результатов от 14.04.2022). Результаты диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций по микробиологии, биотехнологии, проведении лабораторно-практических занятий и написании дипломных работ в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

**Методология и методы исследования.** Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам получения экзополисахаридов молочнокислых бактерий и изучению их биологических свойств. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы. При проведении исследования и изложения материала были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных результатов и выводов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* не являются токсичными в концентрации 0,06 г/л для биотест-объектов *C. steinii* и белых новозеландских кроликов.

2. Культуры *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и их ЭПС проявляют антимикробную активность в отношении некоторой условно-патогенной микрофлоры, при этом ЭПС оказывали более выраженное воздействие. Наибольшую подавляющую способность проявлял ЭПС *S. thermophilus*.

3. Экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в концентрации 0,06 г/л оказывают стимулирующее влияние на фагоцитарную активность альвеолярными (АМФ) и перитонеальными (ПМФ) макрофагами белых мышей в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р, продукцию цитокина ИЛ-1 $\alpha$ , но не оказывали влияния на продукцию ФНО- $\alpha$ .

4. Экзополисахарид *S. thermophilus* при добавлении в корм способствует увеличению ихтиомассы и количества молочнокислых бактерий в кишечнике ленокского осетра, не оказывая негативного влияния на биохимические показатели крови, улучшает органолептические показатели мяса рыбы, а также способствует уменьшению затрат кормов.

5. Созданы пленочные покрытия на основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и изучены их некоторые физические и ранозаживляющие свойства. Пленочные покрытия способствуют более быстрому заживлению ожоговых ранений у крыс, в большей степени – пленочное покрытие, созданное на основе ЭПС *S. thermophilus*.

6. Экзополисахариды ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в виде раствора и пленочных покрытий, созданных на их основе, в равной степени способствуют значительному уменьшению числа бактерий группы кишечной палочки и стафилококков в ожогах у крыс и нормальному (не патологическому), течению процесса заживления без осложнений.

**Работа выполнена** на кафедре микробиологии и биотехнологии факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

#### **Степень достоверности и апробация работы**

Степень достоверности результатов обеспечена использованием стандартных микробиологических, биотехнологических, биохимических и физиологических методов исследований и методов статистической обработки данных.

Основные материалы диссертационной работы были представлены на: конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы 2013-2021 гг. Саратовского ГАУ им. Н.И. Вавилова (Саратов, 2014-2021); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий» (Саратов, 2015); Международной конференции молодых ученых «Иностранный язык как средство научной коммуникации» (Саратов, 2015); Всероссийском конкурсе научно-технического творчества молодежи «НТТМ-2015» (Москва, 2015); III Ежегодной Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2015); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий» (Саратов, 2016); VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016); Международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии» (Саратов, 2017); 1-м Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017); IV Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2017); 22-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018); 23-ей Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2019); IX Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2019); Всероссийской конференции с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019); 24-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2020); Международной научной конференции PLAMIC 2020

«Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения» (Саратов, 2020; 2022); III Всероссийской (национальной) научно-практической конференции «АПК России: образование, наука, производство» (Саратов, 2021).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 5 статей из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

**Личный вклад соискателя** состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах диссертационной работы, интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций, участии в конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, двух глав: обзора литературы и экспериментальной части, включающей объект, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа изложена на 121 странице, содержит 24 таблицы, 5 рисунков. Список литературы включает 223 наименований, в том числе 118 отечественных, 105 зарубежных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований явились ЭПС молочнокислых бактерий *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, полученные нами ранее (Фокина, Урядова, Карпунина, 2016, 2018). Культура *L. lactis* В-1662 была получена из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пущино), *S. thermophilus* – из ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (г. Москва). В работе также использовали бактерии: *E. coli* 113-13, полученные из коллекции кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского; *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* 209-Р, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* K2, *C. albicans* 223, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского; *C. albicans* 13108 – из музея культур Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»; *P. aeruginosa* AT-31, *B. subtilis* 262 – из Коллекции ризосферных бактерий Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ «Саратовский научный центр Российской академии наук».

Все экспериментальные исследования с животными выполнены в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.12.1999 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986 г.).

Определение токсичности проводили согласно ГОСТ 31674-2012 с использованием в качестве биотест-объектов инфузорий *C. steinii* и новозеландских белых кроликов.

Влияние молочнокислых бактерий и их ЭПС на бактерии и грибы изучали методами серийных разведений и диффузии в агар (Лабинская, 1978).

Для определения провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  использовали экзополисахариды в концентрации 0,06 г/л, которые вводили однократно по 0,2 мл внутривентриально беспородным белым мышам-самцам массой 18-20 г, возрастом 2-3 месяца. АМФ и ПМФ выделяли из легких и брюшной полости по общепринятой методике (Кондратьева и др., 2001) на 1, 3, 5 и 7 сутки после введения ЭПС. В качестве объекта фагоцитоза использовали суточную культуру *S. aureus* 209-P. Провоспалительные цитокины, продуцируемые макрофагами в процессе фагоцитоза, определяли в культуральной жидкости с помощью иммуноферментных моноклональных тест-систем (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург). Результаты учитывали на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм.

Для моделирования процесса фагоцитоза использовали среду 199 (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Исследовали три группы животных: 1 группа – контрольная (интактные мыши); 2 группа – мыши, которым вводили ЭПС *L. lactis* B-1662; 3 группа – мыши, которым вводили ЭПС *S. thermophilus*. Бактериальные клетки *S. aureus* 209-P добавляли во взвесь макрофагов в соотношении 50:1 и инкубировали при 37 °С. Активность макрофагов на разных стадиях фагоцитоза оценивали через 30 минут, 1, 6 и 24 часа инкубации. Учет результатов осуществляли микроскопически, предметные стекла с макрофагами окрашивали по Романовскому-Гимзе (Лабинская, 1978). Индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) и индекс активации киллинга (ИАК) вычисляли по общепринятым методикам (Кондратьева и др., 2001).

Массу рыб ленского осетра определяли на весах платформенных электронных «Меркурий 330». Биохимические показатели крови рыб определяли на анализаторе СЕМ WELL (США). Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в кишечнике рыб определяли методом последовательных разведений (Лабинская, 1978) на мясо-пептонном агаре (МПА), количество молочнокислых бактерий – на среде лактобакагар (ЛБА).

Органолептические показатели мяса рыбы оценивали по следующим показателям: внешний вид, цвет, консистенция, вкус, запах; бульона – внешний вид (прозрачность), цвет, вкус, запах по 5-бальной шкале (ГОСТ 31986-2012; ГОСТ 7631-2008).

Создание пленочных покрытий на основе ЭПС молочнокислых бактерий проводили по методам (Пассаглия, Маршессо, 1975; Денисова и др., 2014) в нашей модификации. Определение прочности и растяжимости пленочных покрытий проводили на текстурном анализаторе «СТЗ 4500 Brookfield» (США). Толщину пленочных покрытий определяли толщинометром Roadweller RW-TM-05 (Китай). Динамическую вязкость растворов пленочных покрытий определяли с помощью ротационного вискозиметра Thermo Scientific HAAKE Viscotester 7R (Германия).

Ранозаживляющие свойства ЭПС *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* и пленочных покрытий, созданных на их основе, определяли на модели ожоговых ран у самок белых беспородных крыс, массой 270-300 г. Крысы были разделены на 7 групп. Контрольные: 1 группа – интактные животные; 2 группа – животные, у которых вызывали ожог; 3 группа – животные, у которых вызывали ожог и после ожога наносили коммерческий препарат 5% декспантенол («Пантодерм», АО «АКРИХИН», Россия); опытные: 4 группа – животные с ожоговой раной, на которую наносили пленочное покрытие, созданное на основе ЭПС *L. lactis* B-1662; 5 группа – животные



с ожоговой раной, на которую наносили пленочное покрытие, созданное на основе ЭПС *S. thermophilus*; 6 группа – раствор ЭПС *L. lactis* В-1662 и 7 группа – раствор ЭПС *S. thermophilus* в концентрации 0,06 г/л. Ожог степени IIIa моделировали под эфирным наркозом на межлопаточном пространстве крысы дном пробирки (площадь – 2х2 см) с кипящей водой (2/3 объема пробирки) в течение 30 секунд (Пономарь, 2012). Нанесение 5% декспантенола, и ЭПС в виде растворов и пленочных покрытий на место ожога осуществляли сразу же после воспроизведения ожога и далее ежедневно в течение 28 суток. О процессе заживления ожога судили по изменению площади поврежденной поверхности, восстановлению шерстного покрова, зарастанию ран (Пономарь, 2012) через 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 23, 25 и 28 сутки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов на поверхности ран (2х2 см) у крыс определяли, используя мясо-пептонный агар (МПА); бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – среды Кесслер и Эндо; стафилококков – солевой бульон и желточно-солевой агар (ЖСА).

Количество лейкоцитов подсчитывали по методу зигзага (по линии «Меандра») (Никитин, 1949) через 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 23, 25, 28 сутки. Для подсчета лейкоцитов проводили визуальную микроскопическую оценку сухих фиксированных окрашенных по Романовскому-Гимза (Никитин, 1949) мазков крови.

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам (Воробьев, Елсуков, 1989). Использовали параметрический t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ . Вычисления проводили с использованием программы StatPlus 2007 Professional 4.9.4.1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Оценка токсичности экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на тест-объектах *C. steinii* и кроликах

Определение токсичности ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* проводили по ГОСТ 31674-2012.

При изучении токсичности на инфузориях *C. steinii* было показано, что при добавлении водного раствора ЭПС *L. lactis* В-1662 в концентрации 0,06 г/л на протяжении всего времени исследования (в течение 3 часов) с регистрацией каждые 15 минут, колподы оставались подвижными, их поведение не отличалось от движения и скорости инфузорий в контроле. Изменения морфологии и гибели инфузорий не происходило. Аналогичную картину наблюдали и в отношении ЭПС *S. thermophilus*. Результаты исследования свидетельствуют, что при данной концентрации экзополисахаридов простейшие сохраняли 100 % жизнеспособность. Подобную тенденцию в отношении *C. steinii* наблюдали и у ЭПС лактобацилл (Правдивцева, 2012).

При изучении кожно-раздражающего действия, исследуемые ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в концентрации 0,06 г/л наносили на депилированный участок кожи (межлопаточную область) белых новозеландских кроликов. Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБУ «Саратовская межобластная ветеринарная лаборатория». Наблюдения за состоянием кожи кроликов проводили в течение 3 суток. Было отмечено, что ЭПС и *L. lactis* В-1662, и *S. thermophilus* не вызывали воспалительной реакции кожи, гиперемии и шелушения кожи не наблюдали.

Таким образом, согласно ГОСТ 31674-2012, исследуемые ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, являются не токсичными.

### **Влияние *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и их экзополисахаридов на микроорганизмы**

При изучении влияния культур *L. lactis* В-1662 на рост ряда микроорганизмов было показано, что бактерии *L. lactis* В-1662 (в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл) проявляли антимикробную активность в отношении *E. coli* 113-13 и АТСС 25922, *S. aureus* 209-Р, *P. aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853, *B. subtilis* 262 и не подавляли рост *K. pneumoniae* К2 и грибов *C. albicans* 223 и 13108.

Культура *S. thermophilus* (в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл) подавляла рост следующих тест-культур: *E. coli* 113-13 и АТСС 25922, *S. aureus* 209-Р, *K. pneumoniae* К2, *P. aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853. Наибольшую зону лизиса наблюдали у *K. pneumoniae* К2. В отношении же *B. subtilis* 262 и грибов рода *Candida* антимикробного эффекта не наблюдалось.

Полученные данные хорошо согласуются с работами других исследователей по ингибированию молочнокислыми бактериями роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, таких как *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* (Coconnier et al., 1997; Ленцнер, Ленцнер, Карки, 1998; Golowczyc et al., 2007; Resta-Lenert, Warren, 2003) и отсутствию подавления роста *C. albicans* (Ленцнер, Ленцнер, Карки, 1998).

При определении антимикробной активности ЭПС молочнокислых кокков было показано, что ЭПС *L. lactis* В-1662 в концентрации 0,006 г/л оказывал антимикробное воздействие на *S. aureus* 209-Р, *P. aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853, *B. subtilis* 262, а в концентрации 0,06 г/л еще и на *E. coli* 113-13 и АТСС 25922. Наибольшую зону лизиса наблюдали у *S. aureus* 209-Р.

Обнаружено, что ЭПС *S. thermophilus* в концентрациях 0,006 г/л и 0,06 г/л угнетал рост *E. coli* 113-13 и АТСС 25922, *S. aureus* 209-Р, *K. pneumoniae* К2, *P. aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853. Экзополисахарид в концентрации 0,06 г/л оказывал большее бактерицидное действие, чем в концентрации 0,006 г/л. Наибольший антибактериальный эффект ЭПС наблюдали в отношении *K. pneumoniae* К2. Также как и ЭПС *L. lactis* В-1662, ЭПС *S. thermophilus*, взятый в концентрации 0,06 г/л, оказывал большее бактерицидное действие, чем в концентрации 0,006 г/л. Однако диаметр стерильных зон при влиянии ЭПС *L. lactis* В-1662 был меньше, чем при влиянии ЭПС стрептококка.

Исходя из того, что культуры *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* обладали бактерицидными свойствами и проявляли угнетающее действие в отношении этих же тест-культур, что и ЭПС, вполне очевидно предположить, что угнетающее действие на рост бактерий могли оказывать именно ЭПС. Однако на изучаемых грибах это свойство не обнаруживалось.

Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что антибактериальное действие молочнокислых бактерий, наряду с другими веществами (молочная кислота, антибиотики и др.), может обуславливаться и такими биополимерами, как полисахариды.

### **Влияние экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на процесс фагоцитоза макрофагами мышей**

В ходе исследований по изучению влияния ЭПС молочнокислых бактерий на процесс фагоцитоза макрофагами мышей было показано, что у контрольной группы мышей, которым не вводили внутривенно ЭПС, максимальная активность макрофагов как ПМФ, так и АМФ, наблюдалась через 24 часа. Причем активность

АМФ в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р через 30 минут, 1, 6 и 24 часа была выше по сравнению с ПМФ (Таблица 1). В опытной группе животных, которым вводили ЭПС *L. lactis* В-1662, активность ПМФ и АМФ достигала максимума уже к 6 часам фагоцитоза *S. aureus* 209-Р на протяжении всего эксперимента и было достоверно выше контроля (Таблица 1). Количество активных ПМФ и АМФ было наибольшим на 1-5 сутки после введения ЭПС мышам и активность АМФ была также, как и в контроле, чуть выше активности ПМФ.

Таблица 1 – Влияние ЭПС *L. lactis* В-1662 на число фагоцитирующих макрофагов мышей в процессе фагоцитоза

| Время иммуногенеза    | Макрофаги | Количество активных макрофагов |                       |                        |                       |
|-----------------------|-----------|--------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                       |           | 30 мин                         | 1 ч                   | 6 ч                    | 24 ч                  |
| контроль<br>(без ЭПС) | ПМФ       | 7,0±0,3                        | 9,0±0,5*              | 8,0±0,7*               | 15,0±0,5*             |
|                       | АМФ       | 8,0±0,3                        | 11,0±0,5*             | 8,0±0,5*               | 18,0±0,9*             |
| 1 сутки               | ПМФ       | 4,0±0,5 <sup>•</sup>           | 5,0±0,2* <sup>•</sup> | 22,0±0,5* <sup>•</sup> | 8,0±0,4* <sup>•</sup> |
|                       | АМФ       | 4,0±0,4 <sup>•</sup>           | 7,0±0,4* <sup>•</sup> | 23,0±0,8* <sup>•</sup> | 9,0±0,5* <sup>•</sup> |
| 3 сутки               | ПМФ       | 5,0±0,4 <sup>•</sup>           | 8,0±0,5*              | 22,0±0,5* <sup>•</sup> | 7,0±0,4* <sup>•</sup> |
|                       | АМФ       | 6,0±0,4 <sup>•</sup>           | 9,0±0,5* <sup>•</sup> | 25,0±0,7* <sup>•</sup> | 8,0±0,4* <sup>•</sup> |
| 5 сутки               | ПМФ       | 8,0±0,2 <sup>•</sup>           | 7,0±0,4* <sup>•</sup> | 16,0±0,7* <sup>•</sup> | 6,0±0,2* <sup>•</sup> |
|                       | АМФ       | 8,0±0,5                        | 7,0±0,4 <sup>•</sup>  | 19,0±0,6* <sup>•</sup> | 5,0±0,5* <sup>•</sup> |
| 7 сутки               | ПМФ       | 6,0±0,4                        | 9,0±0,9*              | 10,0±0,4* <sup>•</sup> | 7,0±0,6*              |
|                       | АМФ       | 7,0±0,5                        | 10,0±0,4*             | 11,0±0,3* <sup>•</sup> | 7,0±0,8 <sup>•</sup>  |

Примечание –  $p \leq 0,05$  относительно \* – показателя через 30 мин фагоцитоза в этой же группе; <sup>•</sup> – контроля.

При введении ЭПС *S. thermophilus* в организм мышей была отмечена аналогичная тенденция, как и в случае с ЭПС *L. lactis* В-1662. Наблюдали увеличение активности макрофагов к 6 часам как для ПМФ, так и АМФ. Активность АМФ также была чуть выше активности ПМФ (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние ЭПС *S. thermophilus* на число фагоцитирующих макрофагов мышей в процессе фагоцитоза

| Время иммуногенеза    | Макрофаги | Количество активных макрофагов |           |                        |                       |
|-----------------------|-----------|--------------------------------|-----------|------------------------|-----------------------|
|                       |           | 30 мин                         | 1 ч       | 6 ч                    | 24 ч                  |
| контроль<br>(без ЭПС) | ПМФ       | 7,0±0,3                        | 9,0±0,5*  | 8,0±0,7*               | 15,0±0,5*             |
|                       | АМФ       | 8,0±0,3                        | 11,0±0,5* | 8,0±0,5*               | 18,0±0,9*             |
| 1 сутки               | ПМФ       | 6,0±0,5                        | 8,0±0,4*  | 24,0±0,5* <sup>•</sup> | 7,0±1,0 <sup>•</sup>  |
|                       | АМФ       | 8,0±0,6                        | 10,0±0,5* | 29,0±0,4* <sup>•</sup> | 8,0±0,5 <sup>•</sup>  |
| 3 сутки               | ПМФ       | 7,0±0,6                        | 9,0±0,5*  | 26,0±0,5* <sup>•</sup> | 8,0±1,5 <sup>•</sup>  |
|                       | АМФ       | 7,0±0,4                        | 10,0±0,5* | 32,0±0,8* <sup>•</sup> | 7,0±1,0 <sup>•</sup>  |
| 5 сутки               | ПМФ       | 7,0±0,4                        | 9,0±0,6*  | 19,0±0,7* <sup>•</sup> | 7,0±1,0 <sup>•</sup>  |
|                       | АМФ       | 8,0±0,5                        | 10,0±0,6* | 23,0±0,6* <sup>•</sup> | 6,0±0,5* <sup>•</sup> |
| 7 сутки               | ПМФ       | 9,0±0,5                        | 9,0±0,6   | 11,0±0,4* <sup>•</sup> | 3,0±1,0* <sup>•</sup> |
|                       | АМФ       | 12,0±0,8                       | 10,0±0,5* | 15,0±0,6* <sup>•</sup> | 2,0±0,8* <sup>•</sup> |

Примечание –  $p \leq 0,05$  относительно \* – показателя через 30 мин фагоцитоза в этой же группе; <sup>•</sup> – контроля.

В процессе дальнейших исследований были определены такие показатели как индекс завершенности фагоцитоза и индекс активации киллинга. Было установлено, что в контрольной группе животных к концу эксперимента (7 суток) ИЗФ для ПМФ составил -0,70 и для АМФ -0,64, что свидетельствовало о незавершённости фагоцитарного процесса (Таблица 3). В опытной группе мышей, которым вводили ЭПС *L. lactis* В-1662, ИЗФ для ПМФ составил 0,23 и для АМФ 0,30, что говорило о частичном переваривании микробных клеток. На 7 сутки эксперимента ИАК увеличивался в 9,3 раза для ПМФ и в 1,5 раза для АМФ по сравнению с 1 сутками.

Таблица 3 – Влияние ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на индекс завершенности фагоцитоза и индекс активации киллинга

| Время иммуногенеза | Макрофаги | ЭПС <i>L. lactis</i> В-1662 |      | ЭПС <i>S. thermophilus</i> |      |
|--------------------|-----------|-----------------------------|------|----------------------------|------|
|                    |           | ИЗФ                         | ИАК  | ИЗФ                        | ИАК  |
| контроль (без ЭПС) | ПМФ       | -0,70                       | 0    | -0,70                      | 0    |
|                    | АМФ       | -0,64                       | 0    | -0,64                      | 0    |
| 1 сутки            | ПМФ       | -0,60                       | 0,10 | 0,13                       | 0,83 |
|                    | АМФ       | -0,30                       | 0,34 | 0,20                       | 0,84 |
| 3 сутки            | ПМФ       | 0,13                        | 0,83 | 0,12                       | 0,82 |
|                    | АМФ       | 0,12                        | 0,76 | 0,30                       | 0,94 |
| 5 сутки            | ПМФ       | 0,14                        | 0,84 | 0,23                       | 0,93 |
|                    | АМФ       | 0,17                        | 0,81 | 0,40                       | 1,04 |
| 7 сутки            | ПМФ       | 0,23                        | 0,93 | 0,70                       | 1,40 |
|                    | АМФ       | 0,30                        | 0,94 | 0,80                       | 1,44 |

У опытных мышей, которым вводили ЭПС *S. thermophilus*, процесс фагоцитоза был частично завершен уже на 3 сутки и завершался к 7 суткам (Таблица 3) и составлял 0,70 для ПМФ и 0,80 для АМФ, что свидетельствовало практически о завершении фагоцитоза. Наблюдали увеличение переваривания микробных клеток (ИАК) для ПМФ и АМФ в 1,7 раз в обоих случаях по сравнению с 1 сутками. ИАК на 7 сутки у ПМФ и АМФ был в 1,5 раза выше по сравнению с аналогичными показателями в опыте с ЭПС *L. lactis* В-1662. ИЗФ на 7 сутки у ПМФ был в 3 раза, АМФ в 2,6 раза выше по сравнению с воздействием ЭПС *L. lactis* В-1662.

Активность макрофагов мышей, которым вводили ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на 1, 3, 5 и 7 сутки существенно отличалась от контрольных значений на завершающих стадиях процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. Исследуемые ЭПС, влияя на ПМФ и АМФ, оказывали значительное воздействие на процесс фагоцитоза. Эти результаты хорошо коррелирует с литературными данными относительно других бактерий и молочнокислых в том числе (Nishimura-Uemura, Kleerebezem, Sralowska, 2003; Im et al., 2010). Установлено, что наибольшее воздействие данные ЭПС оказывали на АМФ. Подобная тенденция характерна и для ЭПС лактобацилл (Горельникова, Карпунина, 2015). Как видно из представленных данных, воздействие ЭПС стрептококка на процесс фагоцитоза, было более выраженным, чем ЭПС лактококка: он активировал процесс фагоцитоза в несколько раз (в 3 и 2,6 раз для ПМФ и АМФ соответственно по сравнению с ЭПС *L. lactis* В-1662, о чем свидетельствуют значения ИЗФ) и ускорял завершение (в 1,5 раза для ПМФ и АМФ, о чем свидетельствуют значения ИАК). Фагоцитоз был полностью завершен на 7 сутки.

**Влияние экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на цитокиновый статус мышей при моделировании стафилококковой инфекции**

При изучении влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на цитокиновый статус мышей при моделировании стафилококковой инфекции было показано, что изучаемые ЭПС способны индуцировать провоспалительные цитокины ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ , но характер воздействия был различен. Так, максимальное увеличение продукции ИЛ-1 $\alpha$  альвеолярными макрофагами под влиянием ЭПС *L. lactis* В-1662 по сравнению с контролем наблюдали в 1 (в 2,2 раза в 30 минут), 5 (в 1,8 раз в 30 минут) и 7 сутки (в 2 раза в 6 часов). Перитонеальные макрофаги продуцировали ИЛ-1 $\alpha$  выше контрольных в 2,9 и 7,7 раза на 1 (1 час) и 7 (24 часа) сутки соответственно (Таблица 4). При изучении влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 на продукцию ФНО- $\alpha$  макрофаги не были активны в продукции ФНО- $\alpha$ .

Таблица 4 – Влияние экзополисахарида *L. lactis* В-1662 на синтез ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  макрофагами мышей при фагоцитозе *S. aureus* 209-Р

| Макрофаги                        |                               | Время процесса фагоцитоза      |                                 |                                 |                                 |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                                  |                               | 30 мин                         | 1 ч                             | 6 ч                             | 24 ч                            |
| Содержание ИЛ-1 $\alpha$ , пг/мл |                               |                                |                                 |                                 |                                 |
| Контроль                         | АМФ                           | 54,30 $\pm$ 0,12               | 84,30 $\pm$ 0,14*               | 54,30 $\pm$ 0,12                | 558,00 $\pm$ 0,13*              |
|                                  | ПМФ                           | 51,30 $\pm$ 0,12               | 57,30 $\pm$ 0,11*               | 53,30 $\pm$ 0,13                | 100,00 $\pm$ 0,15*              |
| Опыт                             | 1 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 120,80 $\pm$ 0,11 <sup>•</sup> | 119,30 $\pm$ 0,17 <sup>•</sup>  | 77,30 $\pm$ 0,20* <sup>•</sup>  | 131,30 $\pm$ 0,15* <sup>•</sup> |
|                                  | ПМФ                           | 107,30 $\pm$ 0,12 <sup>•</sup> | 169,30 $\pm$ 0,25* <sup>•</sup> | 146,80 $\pm$ 0,21* <sup>•</sup> | 150,00 $\pm$ 0,25* <sup>•</sup> |
|                                  | 3 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 80,30 $\pm$ 0,13 <sup>•</sup>  | 60,30 $\pm$ 0,32* <sup>•</sup>  | 47,80 $\pm$ 0,12* <sup>•</sup>  | 59,80 $\pm$ 0,19* <sup>•</sup>  |
|                                  | ПМФ                           | 98,30 $\pm$ 0,12 <sup>•</sup>  | 66,80 $\pm$ 0,18* <sup>•</sup>  | 87,30 $\pm$ 0,21* <sup>•</sup>  | 114,80 $\pm$ 0,23* <sup>•</sup> |
|                                  | 5 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 97,30 $\pm$ 0,27 <sup>•</sup>  | 79,80 $\pm$ 0,17 <sup>•</sup>   | 50,80 $\pm$ 0,11*               | 51,80 $\pm$ 0,13* <sup>•</sup>  |
|                                  | ПМФ                           | 58,30 $\pm$ 0,25 <sup>•</sup>  | 89,30 $\pm$ 0,21 <sup>•</sup>   | 52,80 $\pm$ 0,25*               | 57,80 $\pm$ 0,18* <sup>•</sup>  |
|                                  | 7 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
| АМФ                              | 65,80 $\pm$ 0,21 <sup>•</sup> | 94,80 $\pm$ 0,13* <sup>•</sup> | 110,30 $\pm$ 0,16* <sup>•</sup> | 150,80 $\pm$ 0,15* <sup>•</sup> |                                 |
| ПМФ                              | 53,80 $\pm$ 0,20 <sup>•</sup> | 64,30 $\pm$ 0,17* <sup>•</sup> | 46,80 $\pm$ 0,22* <sup>•</sup>  | 775,80 $\pm$ 0,31* <sup>•</sup> |                                 |
| Содержание ФНО- $\alpha$ , пг/мл |                               |                                |                                 |                                 |                                 |
| Контроль                         | АМФ                           | 1,24 $\pm$ 0,22                | 1,32 $\pm$ 0,12                 | 1,35 $\pm$ 0,17                 | 1,60 $\pm$ 0,23                 |
|                                  | ПМФ                           | 1,20 $\pm$ 0,28                | 1,45 $\pm$ 0,23                 | 2,30 $\pm$ 0,32                 | 1,42 $\pm$ 0,15                 |
| Опыт                             | 1 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 1,37 $\pm$ 0,12                | 1,29 $\pm$ 0,13                 | 1,39 $\pm$ 0,28                 | 2,20 $\pm$ 0,11                 |
|                                  | ПМФ                           | 1,34 $\pm$ 0,11                | 1,50 $\pm$ 0,18                 | 1,37 $\pm$ 0,16                 | 1,40 $\pm$ 0,18                 |
|                                  | 3 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 1,30 $\pm$ 0,22                | 1,37 $\pm$ 0,32                 | 1,51 $\pm$ 0,15                 | 2,40 $\pm$ 0,21                 |
|                                  | ПМФ                           | 1,50 $\pm$ 0,2                 | 1,35 $\pm$ 0,18                 | 1,50 $\pm$ 0,21                 | 1,69 $\pm$ 0,17                 |
|                                  | 5 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 1,45 $\pm$ 0,15                | 1,37 $\pm$ 0,21                 | 1,47 $\pm$ 0,17                 | 1,39 $\pm$ 0,11                 |
|                                  | ПМФ                           | 1,58 $\pm$ 0,12                | 1,45 $\pm$ 0,17                 | 1,43 $\pm$ 0,18                 | 1,40 $\pm$ 0,21                 |
|                                  | 7 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
| АМФ                              | 1,50 $\pm$ 0,23               | 1,40 $\pm$ 0,13                | 1,42 $\pm$ 0,21                 | 1,57 $\pm$ 0,17                 |                                 |
| ПМФ                              | 1,40 $\pm$ 0,15               | 1,44 $\pm$ 0,27                | 1,60 $\pm$ 0,25                 | 1,58 $\pm$ 0,15                 |                                 |

Примечание –  $p \leq 0,05$  относительно: \* – показателя через 30 мин процесса фагоцитоза в этой же группе; <sup>•</sup> – контроля.

Под действием ЭПС *S. thermophilus* альвеолярные макрофаги были наиболее активны в продуцировании ИЛ-1 $\alpha$  на 3 и 7 сутки (в 3,3 и 2,7 раз соответственно в 6 часов) процесса фагоцитоза. Тенденция к повышению продукции ИЛ-1 $\alpha$  наблюдалась и в отношении перитонеальных макрофагов на 5 и 7 сутки эксперимента. Продукция ПМФ ИЛ-1 $\alpha$  под действием ЭПС *S. thermophilus* через 24 ч фагоцитоза была выше контрольных значений в 3,2 и 1,3 раза для 5 и 7 суток соответственно (Таблица 5). При изучении влияния ЭПС *S. thermophilus* на продукцию ФНО- $\alpha$  макрофаги также как и в случае с ЭПС *L. lactis* В-1662 не были активны в продукции ФНО- $\alpha$ .

Таблица 5 – Влияние экзополисахарида *S. thermophilus* на синтез ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  макрофагами мышей при фагоцитозе *in vitro* *S. aureus* 209-P

| Макрофаги                        |                               | Время процесса фагоцитоза      |                                 |                                 |                                 |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                                  |                               | 30 мин                         | 1 ч                             | 6 ч                             | 24 ч                            |
| Содержание ИЛ-1 $\alpha$ , пг/мл |                               |                                |                                 |                                 |                                 |
| Контроль                         | АМФ                           | 54,30 $\pm$ 0,12               | 84,30 $\pm$ 0,14*               | 54,30 $\pm$ 0,12                | 558,00 $\pm$ 0,13*              |
|                                  | ПМФ                           | 51,30 $\pm$ 0,12               | 57,30 $\pm$ 0,11*               | 53,30 $\pm$ 0,13                | 100,00 $\pm$ 0,15*              |
| Опыт                             | 1 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 51,30 $\pm$ 0,22 <sup>•</sup>  | 44,80 $\pm$ 0,12* <sup>•</sup>  | 40,30 $\pm$ 0,24* <sup>•</sup>  | 782,00 $\pm$ 0,11* <sup>•</sup> |
|                                  | ПМФ                           | 96,80 $\pm$ 0,12 <sup>•</sup>  | 53,80 $\pm$ 0,21* <sup>•</sup>  | 55,30 $\pm$ 0,31*               | 84,80 $\pm$ 0,12* <sup>•</sup>  |
|                                  | 3 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 76,30 $\pm$ 0,12 <sup>•</sup>  | 106,30 $\pm$ 0,15* <sup>•</sup> | 180,80 $\pm$ 0,22* <sup>•</sup> | 211,80 $\pm$ 0,17* <sup>•</sup> |
|                                  | ПМФ                           | 65,30 $\pm$ 0,13 <sup>•</sup>  | 115,30 $\pm$ 0,2* <sup>•</sup>  | 79,30 $\pm$ 0,21* <sup>•</sup>  | 74,30 $\pm$ 0,13* <sup>•</sup>  |
|                                  | 5 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 82,80 $\pm$ 0,15 <sup>•</sup>  | 89,30 $\pm$ 0,21 <sup>•</sup>   | 84,80 $\pm$ 0,12 <sup>•</sup>   | 121,80 $\pm$ 0,23* <sup>•</sup> |
|                                  | ПМФ                           | 120,30 $\pm$ 0,17 <sup>•</sup> | 134,30 $\pm$ 0,31* <sup>•</sup> | 111,80 $\pm$ 0,12 <sup>•</sup>  | 328,30 $\pm$ 0,28* <sup>•</sup> |
|                                  | 7 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
| АМФ                              | 94,30 $\pm$ 0,22 <sup>•</sup> | 97,30 $\pm$ 0,25*              | 118,30 $\pm$ 0,17* <sup>•</sup> | 771,80 $\pm$ 0,18* <sup>•</sup> |                                 |
| ПМФ                              | 154,30 $\pm$ 0,2 <sup>•</sup> | 133,80 $\pm$ 0,21*             | 143,30 $\pm$ 0,42* <sup>•</sup> | 133,30 $\pm$ 0,22* <sup>•</sup> |                                 |
| Содержание ФНО- $\alpha$ , пг/мл |                               |                                |                                 |                                 |                                 |
| Контроль                         | АМФ                           | 1,24 $\pm$ 0,22                | 1,32 $\pm$ 0,12                 | 1,35 $\pm$ 0,17                 | 1,60 $\pm$ 0,23                 |
|                                  | ПМФ                           | 1,20 $\pm$ 0,28                | 1,45 $\pm$ 0,23                 | 2,30 $\pm$ 0,32                 | 1,42 $\pm$ 0,15                 |
| Опыт                             | 1 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 1,48 $\pm$ 0,22                | 1,45 $\pm$ 0,12                 | 1,80 $\pm$ 0,28                 | 2,21 $\pm$ 0,3                  |
|                                  | ПМФ                           | 1,27 $\pm$ 0,27                | 1,55 $\pm$ 0,18                 | 2,80 $\pm$ 0,23                 | 3,00 $\pm$ 0,27                 |
|                                  | 3 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 1,48 $\pm$ 0,15                | 1,51 $\pm$ 0,18                 | 2,00 $\pm$ 0,20                 | 1,79 $\pm$ 0,28                 |
|                                  | ПМФ                           | 1,48 $\pm$ 0,27                | 1,50 $\pm$ 0,22                 | 1,43 $\pm$ 0,12                 | 1,79 $\pm$ 0,17                 |
|                                  | 5 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
|                                  | АМФ                           | 2,19 $\pm$ 0,18                | 1,52 $\pm$ 0,30                 | 1,50 $\pm$ 0,17                 | 1,48 $\pm$ 0,22                 |
|                                  | ПМФ                           | 1,70 $\pm$ 0,17                | 1,85 $\pm$ 0,18                 | 2,26 $\pm$ 0,25                 | 1,94 $\pm$ 0,13                 |
|                                  | 7 сутки                       |                                |                                 |                                 |                                 |
| АМФ                              | 1,5 $\pm$ 0,21                | 1,5 $\pm$ 0,17                 | 1,58 $\pm$ 0,28                 | 1,65 $\pm$ 0,21                 |                                 |
| ПМФ                              | 1,34 $\pm$ 0,20               | 1,39 $\pm$ 0,15                | 1,32 $\pm$ 0,31                 | 1,6 $\pm$ 0,25                  |                                 |

Примечание –  $p \leq 0,05$  относительно: \* – показателя через 30 мин процесса фагоцитоза в этой же группе; <sup>•</sup> – контроля.

Таким образом, ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* оказывают влияние на содержание цитокина ИЛ-1 $\alpha$  в сыворотке крови лабораторных мышей. При моделировании процесса фагоцитоза ЭПС термофильного стрептококка, по сравнению с ЭПС лактококка, оказывал более выраженное воздействие на синтез ИЛ-1 $\alpha$ . Полученные результаты доказывают участие ЭПС молочнокислых бактерий в регуляции цитокинового баланса, способствуя иммунному ответу при воспалительном процессе.

### Влияние экзополисахарида *S. thermophilus*

#### на физиологические и органолептические показатели ленского осетра

Исследование влияния ЭПС *S. thermophilus* на организм ленского осетра при добавлении в корм проводили в период с марта по июль 2020 г. Продолжительность эксперимента составила 15 недель. Рыбы (сеголетки, т.е. рыбы, вышедшие из икринок в текущем году) содержались в аквариумах вместимостью 250 л и были распределены на 2 группы: контрольная и опытная, со средней массой примерно 630 г. Особи контрольной группы получали полнорационный гранулированный продукционный комбикорм для осетров Supreme-10, «Сорrens», Нидерланды, а особи опытной группы получали тот же комбикорм с ЭПС из расчета 0,04 г/кг массы рыбы, которая предварительными исследованиями была определена оптимальной.

Было показано, что прирост ихтиомассы в опытной группе рыб был выше на 8,2 % по сравнению с контрольной группой (Таблица 6). Опытная группа опережала контроль по интенсивности роста и среднесуточному приросту на 3,9 % и 8,1 % соответственно. Выживаемость во всех группах составила 100 %.

Таблица 6 – Основные показатели роста, развития и выживаемости ленского осетра

| Показатель                            | Группа             |                     |
|---------------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                       | контроль           | опыт                |
| Ихтиомасса в начале эксперимента, г   | 3200,0 $\pm$ 15,00 | 3140,0 $\pm$ 17,00* |
| Ихтиомасса в конце эксперимента, г    | 5140,0 $\pm$ 25,00 | 5240,0 $\pm$ 30,00* |
| Абсолютный прирост 1 особи за опыт, г | 388,0 $\pm$ 9,00   | 420,0 $\pm$ 9,00*   |
| Относительный прирост, %              | 48,5 $\pm$ 1,00    | 52,4 $\pm$ 1,00*    |
| Среднесуточный прирост, г             | 3,7 $\pm$ 0,09     | 4,0 $\pm$ 0,08*     |
| Выживаемость, %                       | 100,0 $\pm$ 0,00   | 100,0 $\pm$ 0,00    |

Примечание –  $p \leq 0,05$  \* относительно контроля.

Изучение биохимических показателей крови не выявило значительных различий между особей опытной и контрольной групп. Разница была обнаружена только в отношении аспаратаминотрансферазы, активность которого у рыб опытной группы была достоверно ниже значений этого фермента у рыб контрольной группы, и натрия. Коэффициент де Ритиса был в пределах нормальных значений, что свидетельствовало о нормальной работе таких жизненно важных органов как печень и сердце рыб.

Исследование микрофлоры кишечника рыб показало, что КМАФАнМ в опытной группе рыб было меньше, чем в контроле в 2,7 раз, а количество молочнокислых бактерий в 1,9 раза больше.

При определении органолептических показателей у рыбы разницы по вкусовым качествам бульонов практически не было выявлено, а вот отварное мясо рыб опытной группы было вкуснее и плотнее по консистенции мяса рыб контрольной группы.

Были подсчитаны затраты корма на 1 кг прироста, которые в опытной группе были ниже на 0,12 кг, что свидетельствует об экономической эффективности выращивания ленского осетра с использованием в кормлении ЭПС *S. thermophilus*.

Таким образом, введение в рацион ленского осетра ЭПС *S. thermophilus* благоприятно сказывается на физиологическом состоянии рыб и ведет к увеличению ихтиомассы, числа молочнокислых бактерий и подавлению условно-патогенной микрофлоры кишечника, улучшению органолептических показателей рыбного мяса, а также снижению затрат корма.

### **Создание и характеристика пленочных покрытий, созданных на основе экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus***

Для создания пленочных покрытий в качестве основы использовали водный раствор ЭПС (0,06 г/л) *L. lactis* В-1662 или *S. thermophilus*, в качестве структурообразователя – карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) (15 г/л) («Fluka», Швейцария). Для прочности добавляли пластификатор (глицерин). При соотношении 1:1:0,5 получали однородный, прозрачный, студнеобразный гель, который, застывая, образовывал прозрачную пленку.

Было установлено, что созданные нами пленочные покрытия обладают примерно такими же прочностными характеристиками, что и применяемая в пищевой промышленности полиэтиленовая пленка по ГОСТ 10354-82, взятая нами в качестве контроля. Причем, по прочности оба созданных покрытия в 6,5 раз превосходили пленочное покрытие на основе ксантана и хитозана (Белоглазова и др., 2018). По показателям растяжимости оба покрытия в 1,5 и 2,7 раза превосходили пищевую полиэтиленовую пленку и пищевое пленочное покрытие, созданное на основе ксантана и хитозана для пищевых продуктов соответственно. Однако определение толщины пленочных покрытий показало, что пленочные покрытия на основе ЭПС молочнокислых бактерий *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* были толще пищевой полиэтиленовой пленки и пищевого пленочного покрытия на основе ксантана и хитозана. Была определена динамическая вязкость созданных пленочных покрытий, которая составила 550 мПа·с для пленочного покрытия на основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и 520 мПа·с для пленочного покрытия на основе ЭПС *S. thermophilus*. Вязкость была в 2 раза ниже по сравнению с пленочным покрытием на основе ксантана и хитозана.

### **Влияние пленочных покрытий, созданных на основе экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, на заживление ожога у крыс**

При изучении влияния пленочных покрытий, созданных на основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, на заживление ожогов у крыс было показано, что динамика заживления ожоговых ран контрольных (2 и 3) и опытных групп (4 и 5) животных отличалась.

В контрольных группах (2 и 3) животных на 1 сутки на месте ожога наблюдали сухую темно-красного цвета корку с ровными краями (Таблица 7). На протяжении всего эксперимента цвет и форма корки (струпа) не изменялись, уменьшалась только их площадь, начиная с 10 для 2 группы (ожог без лечения) и 14 суток для 3 группы (где для лечения применяли 5% декспантенол) соответственно, отделения струпа от поверхности кожи не происходило. Полное заживление ожоговой раны и восстановление шерстного покрова во 2 группе наблюдали только на 28 сутки. У крыс 3 группы полное заживление раны наблюдали к 25 суткам, а шерстный покров полностью восстанавливался лишь к 28 суткам.



Таблица 7 – Влияние пленочных покрытий, созданных на основе ЭПС молочнокислых бактерий, на заживление ожогов у крыс

| Время,<br>сутки | Группы                        |                                 |  |   |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|--|---|
|                 | 2                             | 3                               | 4  | 5   |
|                 | Контроль                      |                                 | Опыт   |   |
|                 | ожог                          | ожог<br>+<br>5%<br>декспантенол | ожог<br>+<br>пленочное<br>покрытие с<br>ЭПС<br><i>L. lactis</i> В-1662 | ожог<br>+<br>пленочное<br>покрытие с<br>ЭПС<br><i>S. thermophilus</i> |
|                 | Площадь раны, см <sup>2</sup> |                                 |  |   |
| 1               | 2,80±0,30                     | 2,40±0,20                       | 2,20±0,30  | 1,60±0,40 *   |
| 3               | 3,00±0,50                     | 3,00±0,20                       | 1,90±0,17 *•   | 1,40±0,30 *   |
| 5               | 2,40±0,30                     | 2,60±0,30                       | 1,70±0,10 *•   | 1,20±0,30*•   |
| 7               | 2,10±0,20 •                   | 2,50±0,20                       | 1,50±0,30 *•   | 1,00±0,20 *•  |
| 10              | 1,90±0,05•                    | 2,20±0,40                       | 1,40±0,05 *•   | 0,90±0,20 *•  |
| 14              | 1,70±0,08 •                   | 0,4±0,06*•                      | 0,50±0,02•   | 0,20±0,03 *•  |
| 21              | 0,10±0,03•                    | 0,1±0,02 •                      | 0,01±0,002•  | -   |
| 23              | 0,10±0,02 •                   | 0,1±0,01 •                      | -  | -   |
| 25              | 0,10±0,01 •                   | -                               | -  | -   |
| 28              | -                             | -                               | -  | -   |

Примечание – 1 группа – интактные животные

$p \leq 0,05$  относительно: \* показателя в группе «ожог» в тот же срок;

• показателя в первые сутки в этой же группе; «-» – отсутствие раны.

У крыс, для заживления ожогов которых применяли пленочное покрытие, созданное на основе ЭПС лактококка, (группа 4), на 1 сутки эксперимента наблюдали образование сухой корки на поверхности раны желто-бурого цвета. На 5 сутки корка начинала шелушиться и отслаиваться от кожи. К 21 суткам происходило практически полное заживление раны, о чем судили по площади ожога ( $0,01 \pm 0,002$ ), которая была в 10 раз меньше, чем к этому времени во 2 группе животных. Полное заживление кожи было отмечено на 23 сутки, а полное восстановление шерстного покрова происходило на 25 сутки.

При применении для обработки ожога пленочного покрытия, созданного на основе ЭПС стрептококка, у животных 5 группы, также как и у животных 4 группы, через сутки на поверхности раны наблюдали образование сухой корки желто-бурого цвета. Однако было замечено, что заживление ран у данной группы животных, в отличие от крыс 4 группы, начиналось уже с первых суток, корка была меньшего размера. На 5 сутки корка еще больше светлела и начинала отделяться от поверхности кожи. К 21 суткам на месте раны отмечали лишь небольшое покраснение кожи и полное восстановление шерстного покрова. Нагноения ран ни в одной группе животных не наблюдали. За время наблюдения у животных всех групп нарушений функций пищеварения и мочеотделения отмечено не было, гибели крыс в ходе эксперимента также не происходило.

Таким образом, наибольшим регенерирующим эффектом обладало пленочное покрытие, созданное на основе ЭПС *S. thermophilus*. В случае его применения кожно-

шерстный покров был восстановлен на 4 и 7 суток раньше по сравнению с контрольными группами (3 и 2 соответственно), и на 2 суток раньше относительно пленочного покрытия, созданного на основе ЭПС *L. lactis* В-1662.

### **Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий и пленочных покрытий, созданных на их основе, на микрофлору ожога у крыс**

В процессе исследований смывов с ожоговой поверхности, значительных изменений микрофлоры при изучении КМАФАнМ у животных большинства групп не происходило. За исключением животных 5 и 7 групп, раны которых обрабатывали ЭПС *S. thermophilus* и пленочным покрытием на его основе, у которых к моменту заживления раны количество КМАФАнМ было в 1,2 раза меньше (в обеих группах) по сравнению с другими группами крыс. Небольшое увеличение КМАФАнМ наблюдали во 2, 3, 4, 5, 6 и 7 группах животных, в период, начиная с 3 по 21 сутки, возможно это объясняется разгаром инфекционного процесса. На 21 сутки происходило снижение количества микроорганизмов в 4, 5, 6 и 7 группах по сравнению с группой 3, где для лечения применяли 5% декспантенол, а на 28 сутки число микроорганизмов во всех группах было сопоставимо с интактной группой животных.

При определении бактерий группы кишечной палочки было обнаружено их уменьшение в группе крыс с ожогом (2 группа) по сравнению с интактными животными (1 группа). У крыс 4, 5, 6 и 7 групп животных, обработанных растворами ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и пленочными покрытиями, созданными на их основе, происходило значительное их уменьшение по сравнению с 1, 2 и 3 группами – в 10 раз. При этом наиболее выраженный эффект проявил ЭПС *S. thermophilus* и пленочное покрытие на его основе.

При выявлении стафилококков на поверхности ожогов во 2 группе животных по сравнению с интактными животными было отмечено небольшое увеличение числа бактерий. В 3 группе животных количество стафилококков было практически идентично количеству бактерий во 2 группе, однако достоверно больше, чем у крыс группы 1.

В группах крыс 4, 5, 6 и 7, обработанных растворами ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и пленочными покрытиями на их основе, было обнаружено значительное снижение (в 200 раз) числа стафилококков по сравнению с 2 группой животных и с 3 группой крыс, леченных коммерческим препаратом 5% декспантенолом.

Таким образом, растворы ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и пленочные покрытия, созданные на их основе, подавляли условно-патогенную микрофлору ожогов, в 10 и 200 раз для бактерий группы кишечной палочки и стафилококков соответственно по сравнению контролем. Более выраженный эффект наблюдали в отношении ЭПС *S. thermophilus*.

### **Влияние экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и пленочных покрытий, созданных на их основе, на состав лейкоцитов крови крыс при моделировании ожогов**

При изучении влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в виде раствора и пленочных покрытий, созданных на их основе, на процессы заживления ожоговых ран у самок крыс исследовали их влияние на различные формы лейкоцитов (эозинофилы, нейтрофилы, лимфоциты, моноциты) – определяли лейкограмму.

Влияние ЭПС и пленочных покрытий, созданных на их основе, на кроветворную функцию отмечалось с самого начала после моделирования ожога и обработки крыс ЭПС, пленочными покрытиями и 5% декспантенолом. Так, уже с 1 суток отмечалось значительное увеличение количества нейтрофилов – реактивная нейтрофилия (регенеративный сдвиг ядра влево), частой причиной которого являются бактериальные инфекции, сопровождающие ранения, в том числе и ожоги, – во всех группах. Более выраженный эффект наблюдали во 2 контрольной группе с ожогом без лечения и в 5 группе, где использовали для лечения ЭПС *S. thermophilus*. Наличие юных нейтрофилов в 1 – 10 сутки в группах, где применяли 5% декспантенол, ЭПС и пленочные покрытия на их основе, свидетельствует об усилении их продукции костным мозгом, как самый первый ответ на бактериальные инфекции. На 14 сутки наблюдалось снижение уровня нейтрофилов до значений интактной группы, что свидетельствует об окончании воспалительного процесса. В группе с ожогом без лечения подобный эффект наблюдали на 28 сутки.

При определении эозинофилов в 1 сутки наблюдали резкое понижение их числа (относительная анэозинопения) в 2, 3, 4, 5, 6, 7 группах. Через 7 суток их число возрастало в группах 5 (пленочное покрытие на основе ЭПС *S. thermophilus*) и 7 (ЭПС *S. thermophilus*), как и число моноцитов, а через 10 суток их количество увеличивалось и в 3, 4, 6 группах, во 2 группе без лечения – только на 14 сутки. Можно предположить, что именно за счет такой вызываемой реакции – увеличения моноцитов и эозинофилов – изучаемые ЭПС проявляют антимикробную активность. Повышение числа эозинофилов подтверждается данными, полученными нами ранее об увеличении числа макрофагов под действием изучаемых ЭПС. Также можно отметить, что увеличение числа моноцитов-макрофагов стимулирует фактор некроза опухоли, обладающий цитотоксическим и цитостатическим эффектами на опухолевые клетки, что подтверждается нашими исследованиями о стимуляции ЭПС синтеза ФНО- $\alpha$ . Наиболее выраженное влияние на увеличение доли эозинофилов и моноцитов оказал ЭПС *S. thermophilus* и пленочное покрытие на его основе.

При определении концентрации лимфоцитов отмечали их снижение в крови крыс сразу же в 1 сутки после моделирования ожога. Их число начинало восстанавливаться через 3 суток во всех группах. В группах с лечением 3, 4, 5, 6, 7 число лимфоцитов достигло физиологической нормы на 10 сутки по сравнению с группой 2, где их число нормализовалось только к 14 суткам.

В группах крыс (3, 4, 5, 6, 7) с применением исследуемых бактериальных ЭПС, пленочных покрытий на их основе и коммерческого препарата 5% декспантенол процентное содержание лейкоцитов стало восстанавливаться до физиологической нормы раньше (через 10 суток), чем в группе 2 без лечения, где их число нормализовалось только к 28 суткам. Изменений в морфологии лейкоцитов животных опытных групп по сравнению с показателями животных в контроле на протяжении эксперимента установлено не было. Наблюдаемые в ходе эксперимента лимфоцитоз и повышение уровня нейтрофилов характерны для ожоговых ранений, сопровождающихся бактериальными инфекциями.

То есть, исследуемые бактериальные ЭПС и в виде растворов, и в виде пленочных покрытий, увеличивали долю эозинофилов, моноцитов, сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов по сравнению с ожоговой группой без лечения. При этом практически идентичную картину наблюдали и в группе животных, где для лечения использовали 5% декспантенол. Также эти результаты могут свидетельствовать о том, что ЭПС не токсичны и не аллергенны, поскольку не развилась эозинофилия и в

форменных элементах белой крови отсутствовали типичные для патологии морфологические изменения. Исходя из данных лейкограммы, можно говорить о том, что ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и в виде раствора, и в качестве основы пленочных покрытий, способствуют нормальному (не патологическому) течению процесса и благоприятному исходу заживления ожоговых ран при отсутствии осложнений.

### Заключение

В результате проведенной работы была изучена биологическая активность ЭПС молочнокислых бактерий *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*. Исследовано влияние данных ЭПС на бактерии, грибы, инфузории и лабораторных животных (мыши, крысы, кролики). Было показано, что данные ЭПС, являясь нетоксичными, подавляют рост некоторых представителей условно-патогенной микрофлоры. Выявлена способность обоих ЭПС стимулировать фагоцитарную активность, синтез цитокина ИЛ-1 $\alpha$  альвеолярными и перитонеальными макрофагами мышей в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. Использование ЭПС *S. thermophilus* в рационе ленского осетра способствует увеличению массы рыб, улучшает органолептические показатели (вкус и консистенцию) рыбного мяса, уменьшению затрат кормов при их выращивании. На основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* созданы высокопрочные и растяжимые пленочные покрытия, которые ускоряют заживление ожоговых ран у крыс. Экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в виде растворов и в составе пленочных покрытий на их основе подавляют условно-патогенную микрофлору ожога и способствуют нормальному (не патологическому) течению процесса заживления. Наилучший регенерирующий эффект проявлял ЭПС *S. thermophilus* и пленочное покрытие, созданное на его основе. Полученные результаты по изучению биологической активности ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus in vitro* и в организме животных могут найти применение в медико-биологической практике и сельском хозяйстве.

### Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные результаты по изучению биологической активности ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* способствуют пониманию их важной роли в организме животных, свидетельствуют о положительном влиянии на организм рыб, заживлении ожоговых ран животных при применении их в виде пленочных покрытий, открывают возможность и показывают целесообразность их использования в перспективе в животноводстве и других различных отраслях сельского хозяйства.

### Выводы

1. Установлено, что экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в концентрации 0,06 г/л не являются токсичными для биотест-объектов *C. steinii* и белых новозеландских кроликов.

2. Обнаружено, что *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и их ЭПС проявляют антимикробную активность в отношении некоторых представителей условно-патогенной микрофлоры. ЭПС *L. lactis* В-1662 в концентрациях 0,006 г/л и 0,06 г/л оказывал антимикробное воздействие на *S. aureus* 209-Р, *P. aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853, *B. subtilis* 262, в концентрации 0,06 г/л еще на *E. coli* 113-13 и АТСС 25922. ЭПС *S. thermophilus* в концентрациях 0,006 г/л и 0,06 г/л угнетал рост *E. coli* 113-13 и

АТСС 25922, *S. aureus* 209-Р, *K. pneumoniae* К2, *P. aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853. В концентрации 0,06 г/л ЭПС оказывали большее бактерицидное действие.

3. Показано, что ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в концентрации 0,06 г/л *in vitro* усиливает синтез провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\alpha$  и не оказывают влияния на ФНО- $\alpha$  альвеолярными и перитонеальными макрофагами белых мышей в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. Определено стимулирующее влияние изучаемых ЭПС на фагоцитарную активность АМФ и ПМФ при фагоцитозе *S. aureus* 209-Р *in vitro* в концентрации 0,06 /л. Большее влияние оказывал на фагоцитоз ЭПС *S. thermophilus*.

4. Установлено, что использование в кормлении ленского осетра экзополисахарида *S. thermophilus* способствует увеличению их живой массы, повышению количества молочнокислых бактерий в кишечнике, улучшению органолептических показателей (вкуса и консистенции) мяса рыбы, не оказывает влияния на биохимические показатели крови рыб, приводит к снижению затрат корма на 0,12 кг на 1 кг прироста.

5. Пленочные покрытия, созданные на основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и обладающие высокой прочностью и растяжимостью, способствуют заживлению ожогов степени IIIа у крыс и восстановлению кожно-шерстного покрова: на 5 и 7 суток раньше по сравнению с животными без лечения; на 2 и 4 суток – с применением 5% декспантенола соответственно. Наибольший регенерирующий эффект выявлен в отношении пленочного покрытия, созданного на основе ЭПС стрептококка.

6. Показано, что растворы ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* и пленочные покрытия на их основе способствовали значительному уменьшению числа бактерий группы кишечной палочки и стафилококков в микрофлоре ожогов (в 10 и 200 раз соответственно по сравнению с интактными животными, животными без лечения и животными, лечеными 5% декспантенолом) и нормальному, без осложнений, течению процесса заживления. Наиболее выраженный эффект проявил ЭПС *S. thermophilus* и пленочное покрытие на его основе.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

*Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ*

1. Урядова, Г.Т. Изучение бактерицидных и фунгицидных свойств молочнокислых бактерий / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Аграрный научный журнал. – 2016. – №11. – С. 38 – 40.

2. Урядова, Г.Т. Изучение антимикробных свойств экзополисахаридов молочнокислых бактерий / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – №2; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26226> (дата обращения: 21.03.2017).

3. Урядова, Г. Т. Изучение влияния пленочных покрытий на основе экзополисахаридов молочнокислых бактерий на заживление ожогов у крыс / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, А.Ю. Тяпкин, Л.Н. Шорина, Л.В. Карпунина // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, вып. 2. – С. 192 – 195.

4. Урядова, Г.Т. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на синтез провоспалительных цитокинов макрофагами мышей при фагоцитозе *Staphylococcus aureus* / Г.Т. Урядова, Е.А. Горельникова, Н.А. Фокина, А.С.

Долмашкина, Л.В. Карпунина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – №1. – С. 67 – 70.

5. Урядова, Г.Т. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на процесс фагоцитоза макрофагами мышей / Г.Т. Урядова, Е.А. Горельникова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2018. – №3. – С. 52 –56.

*Публикации в сборниках и материалах конференций*

6. Урядова, Г.Т. Изучение антимикробной активности экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2016. – С. 157 – 160.

7. Урядова, Г.Т. Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их применение / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии: материалы международной научно-практической конференции. – Саратов, ИЦ «Наука», 2017. – С. 209 – 211.

8. Урядова, Г.Т. Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их свойства / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина // 1-й Российский микробиологический конгресс: материалы конгресса. – Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 131.

9. Урядова, Г.Т. Биологическая активность экзополисахаридов молочнокислых бактерий / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина, В.А. Маслякова, С.С. Александрова, О.И. Позднякова // IV Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов. – Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 15.

10. Урядова, Г.Т. Микрофлора ожогов у крыс при применении экзополисахаридов молочнокислых бактерий / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.Н. Шорина, С.В. Савина, Л.В. Карпунина // Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. – Пущино, 2018. – С. 317.

11. Фокина, Н.А. Действие экзополисахаридов молочнокислых бактерий на процесс заживления у крыс / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, А.Ю. Тяпкин, Л.Н. Шорина, Л.В. Карпунина // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2018. – №4. – С. 117 – 123.

12. Урядова, Г.Т. Влияние пленочных покрытий, созданных на основе экзополисахаридов молочнокислых бактерий, на микрофлору ожогов у крыс / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Биология – наука XXI века: 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. – Пущино, 2019. – С. 254.

13. Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Перспективы использования экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2019. – С.163.

14. Урядова, Г.Т. Влияние пленочных покрытий на основе экзополисахаридов молочнокислых бактерий на лейкограмму крыс при моделировании ожога / Г.Т. Урядова, С.В. Савина, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Стратегия взаимодействия

микроорганизмов и растений с окружающей средой: материалы IX Всероссийской конференции молодых ученых. – Саратов, 2019. – С. 70.

15. Урядова, Г.Т. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на иммунный статус лабораторных животных / Г.Т. Урядова, С.В. Савина, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии: материалы Всероссийской конференции с международным участием. – Москва: МАКС Пресс, 2019. – С. 126.

16. Урядова, Г.Т. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на некоторые гематологические показатели крыс при моделировании ожога / Г.Т. Урядова, С.В. Савина, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2019. – №3. – С. 314 – 319.

17. Урядова, Г.Т. Пленочные покрытия на основе экзополисахаридов молочнокислых бактерий / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Биология – наука XXI века: сборник тезисов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2020. – С. 363.

18. Урядова, Г.Т. Функциональная значимость экзополисахаридов молочнокислых бактерий в организме животных / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Зыкинские чтения: материалы национальной научно-практической конференции, посвященной памяти д.м.н., профессора Л.Ф. Зыкина / под редакцией О.С. Ларионовой, И.А. Сазоновой. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2020. – С. 170 – 172.

19. Урядова, Г.Т. Пленочные покрытия, созданные на основе экзополисахаридов молочнокислых бактерий, и их использование / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»: материалы 2-ой Международной научной конференции. – Саратов, 2020. – С. 263.

20. Фокина, Н.А. Экзопполисахариды молочнокислых бактерий в заживлении ожоговых ран у крыс / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Н.Ю. Селиванов, Л.В. Карпунина // Аграрные конференции. – 2021. – №3 (27). – С. 26 – 32.

21. Поддубная, И.В. Физиологическое состояние ленского осетра при использовании в кормлении экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / И.В. Поддубная, Л.В. Карпунина, А.А. Васильев, Н.В. Паршакова, А.А. Манаенкова, Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, биотехнологии и морфологии: сб. науч. трудов Национальной науч.-практ. конф. с международным участием, посвященной 70-летию Заслуженного деятеля науки РФ, д.б.н., проф. Баймишева Х.Б. – Кинель, 2021. – С. 35 – 38.

22. Урядова, Г.Т. Получение и свойства пленочных покрытий, созданных на основе экзополисахаридов молочнокислых бактерий / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Аграрные конференции. – 2021. – №30 (6). – С. 15 – 20.

23. Фокина, Н.А. Влияние экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* на микробиологические показатели ленского осетра / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Н.В. Паршакова, И.В. Поддубная, Л.В. Карпунина // Аграрные конференции. – 2021. – №30 (6). – С. 27 – 30.

24. Урядова, Г.Т. Влияние экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* на органолептические показатели ленского осетра / Г.Т. Урядова, Н.В. Паршакова, Г.Е. Рысмухамбетова, И.В. Поддубная, Л.В. Карпунина // АПК России: образование, наука, производство: сборник статей III Всероссийской (национальной) научно-практической конференции. – Пенза: Пензен. гос. аграр. ун-т, 2022. – С. 126 – 128.