

Кириленко
Марина Александровна

**ОЦЕНКА СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ И АУТОПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ
ЛАКТОБАЦИЛЛ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ**

03.02.03-микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иваново - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор

Кузнецов Олег Ювенальевич

Официальные оппоненты:

Романов Виталий Александрович — доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии с вирусологией и иммунологией, заведующий;

Стоянова Лидия Григорьевна — доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра микробиологии биологического факультета, лаборатория физиологии и биохимии микробов, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России)

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.instmech.ru) ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Яковлева Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Среди биотопов человека кишечник занимает особое место, поскольку около 70% микроорганизмов, населяющих организм человека, обитают в толстой кишке (Бондаренко В.М., 2007, Шендеров Б.А., 2017), которая выполняет такие важнейшие функции как абсорбция, секреция электролитов и воды, поддержание гомеостаза и многие другие (Ардатская М.Д., 2017). Проблемы становления, формирования и функционирования нормальной микробиоты человека, а также возможности ее восстановления после нарушений различной степени тяжести, издавна являются важными направлениями в микробиологических исследованиях (Руш К., Руш Ф., 2003).

Одной из наиболее значимых групп микроорганизмов кишечника являются лактобациллы, широко используемые в качестве пробиотических препаратов для коррекции дисбактериозов человека (Kleerebezem M., 2004, Шендеров Б.А., 2016).

В последние годы созданы новые лекарственные препараты, содержащие различные виды лактобацилл (Суворов А.Н., 2018). Однако, несмотря на положительный терапевтический эффект, у ряда лиц наблюдается элиминация из кишечника внесенных микроорганизмов, входящих в состав применяемого пробиотического препарата (Бондаренко В.М., 2007). Поскольку микробный биоценоз каждого человека представляет собой чрезвычайно сложную и уникальную по составу систему, разработка универсальных пробиотиков представляется сомнительной (Ушкалова Е.А., 2007, Aleshkin V.A., 2008).

Клинико–экспериментальные работы по коррекции дисбактериозов показали, что лучший эффект достигается либо при индивидуальном подборе донорских штаммов, либо при использовании собственной микробиоты (Боровкова, Е.А., 2020). Длительное использование аутоштаммов лактобацилл позволяет обеспечить максимальный эффект при восстановлении нормальной микробиоты кишечника (Шендеров Б.А., 2014). Создание общедоступных технологий выделения аутоштаммов лактобацилл для получения пробиотиков индивидуального потребления крайне важно для устранения микробиологических нарушений кишечника и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования

Оценить свойства полученного аутопробиотического комплекса лактобацилл с использованием различных методов исследования бактерий.

Задачи исследования

1. Определить наиболее информативный физиологический показатель состояния клеток лактобацилл на различных уровнях развития (клеточном, видовом и популяционном).

2. Установить межвидовую биосовместимость лактобацилл и оценить влияние условно-патогенной микробиоты на представителей рода *Lactobacillus*.

3. Оценить действие природных биологически активных веществ на различные штаммы лактобацилл.

4. Изучить влияние иммунных факторов слюны на клетки лактобацилл *in vitro*.

5. Разработать способ выделения аутоштаммов лактобацилл, выбрать методы оценки степени чистоты и сохранения жизнеспособности культур полученного аутопробиотического комплекса для контроля его качества.

6. Сравнить аутопробиотические комплексы кишечника родственников разного возраста для их возможного использования внутри семейной группы.

Научная новизна

Установлен физиологический показатель, позволяющий охарактеризовать состояние популяции лактобацилл на клеточном уровне - время генерации для первого и второго поколений клеток. Наиболее информативным показателем оказалось время размножения клеток лактобацилл второго поколения, в котором зафиксирован жизненный цикл отдельной клетки.

Показано, что пробиотические штаммы лактобацилл обладали различным спектром антагонистической активности как в отношении друг друга, так и в отношении штаммов условно-патогенной микробиоты кишечника человека. Информация о биосовместимости культур необходима при конструировании новых биопрепаратов (про- и симбиотиков) для коррекции дисбиотических нарушений кишечной микробиоты.

Выявлено, что пробиотические лактобациллы, обладавшие антагонистической активностью, идентичны у генетически близких родственников.

Впервые установлено, что биологически активные вещества сока и порошка гриба Шиитаке на 40 - 75% стимулируют рост лактобацилл.

На основании полученных данных при изучении свойств лактобацилл разными методами разработан новый аутопробиотический комплекс (АПК). Доказано, что лактобациллы аутопробиотического комплекса при -20°C в условиях длительного хранения (24 месяца) не снижали жизнеспособность.

Теоретическая и практическая значимость

Изучены биологические особенности развития лактобацилл при различных (оптимальных и экстремальных) условиях культивирования.

Получены данные о межвидовых взаимоотношениях лактобацилл на клеточном и популяционном уровнях, расширяющие представления об их симбиотических взаимодействиях с условно-патогенными микроорганизмами и нормальной микробиотой кишечника человека, что явились основой разработки аутопробиотического комплекса.

Установлена длительность хранения лактобацилл без потери их жизнеспособности и активности на протяжении не менее двух лет в условиях низкой температуры (минус 20 °С). Это в перспективе может стать основой для создания криобанка аутоштаммов при получении продуктов индивидуального потребления.

Показана перспективность использования натуральных биологически активных компонентов гриба Шиитаке для стимуляции роста лактобацилл в пробиотических препаратах и аутопробиотических комплексах.

По результатам проведенных исследований получены патенты РФ «Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы» 2014 г. и «Способ получения препарата эубиотика Лактобактерин с добавлением сока или порошка гриба Шиитаке» 2018 г.

На основании полученных данных издано и используется в курсе лекций учебное пособие для студентов «Дисбактериоз кишечника. Причины, симптомы, современная диагностика и эффективное лечение», 2016 г.

Методология и методы исследования

Объектами исследования являлись пробиотические и аутопробиотические штаммы лактобацилл.

Предметом исследования были физиологические свойства разных лактобацилл и оригинального аутопробиотического комплекса (показатели размножения, антагонизм, биосовместимость и др.).

Теоретической основой исследований стали литературные сведения о фундаментальных и прикладных разработках в области микробиологии и микрoэкологии.

Методологической основой работы являлись бактериологические методы (культивирование, микрокультивирование, тестирование на антагонизм), инструментальные методы исследования (нефелометрия, MALDI TOF), статистический анализ и другие специальные методы.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея и планирование научной работы, формулировка цели и задач, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем д.б.н. Кузнецовым О.Ю. Лично автором выполнены микробиологические и нефелометрические исследования, а также анализ полученных масс-спектров методом MALDI TOF. Данные, полученные в ходе выполнения работы, статистически обработаны и проанализированы автором.

По результатам анализа российских и зарубежных источников литературы автором подготовлен аналитический обзор. Все публикации по теме диссертации выполнены автором лично, либо в соавторстве.

Внедрение результатов в практику

Диссертационные материалы, включенные в учебное пособие для студентов («Дисбактериоз кишечника. Причины, симптомы, современная диагностика и эффективное лечение», Иваново, 2016), используются в учебном процессе кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО ИвГМА.

Положения, выносимые на защиту

1. Время деления клеток второго поколения, установленное методом микрокультивирования, характеризует физиологическое состояние лактобацилл в норме и при измененных условиях выращивания, а также под влиянием других бактериальных культур на клеточном и популяционном уровнях.
2. Разработанный способ выделения, накопления и хранения комплекса лактобацилл служит основой для получения пробиотика индивидуального потребления, предназначенного для восстановления микробиоценоза человека.
3. Метод MALDI TOF может быть использован для быстрого определения чистоты выделенного АПК (отсутствие посторонних бактериальных контаминантов) при исследовании групп близких родственников: детей и взрослых.
4. Биологически активные вещества (сок и порошок) гриба Шиитаке стимулируют рост лактобацилл при культивировании пробиотических штаммов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность научных положений и выводов, представленных в работе, подтверждается применением широкого спектра сертифицированных микробиологических методов, характеризующихся высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью, а также адекватным статистическим анализом полученных данных.

Результаты проведенных исследований доложены на 92-ой ежегодной научно - практической конференции студентов и молодых ученых «Неделя науки», посвященной 110-летию со дня рождения профессора С.Д. Носова (г. Иваново, 2012); Молодежном научно-инновационном конкурсе «УМНИК 2013», I этап (г. Иваново, 2013); II этап (г. Ярославль 2013).

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании кафедр микробиологии и вирусологии с другими кафедрами ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России (протокол № 2 от 28 апреля 2021 г.).

Соответствие паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 03.02.03 – «Микробиология» (п. 2, 4, 6, 7, 8, 10).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликована 31 научная работа, из них 7 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 2 патента РФ, а также 1 учебно-методическое пособие для студентов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 182 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырёх глав собственных исследований, содержащих описание объектов и методов исследования, заключения, выводов, списка сокращений и библиографического указателя, включающего 80 работ отечественных и 75 работ зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 17 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Штаммы, использованные в работе. *L. acidophilus* - «Лактобактерин» производства «Биомед» ОАО им. И. И. Мечникова; *L. fermentum 90T-C4* - «Лактобактерин» производства НПО «Микроген»; *L. acidophilus n.v. Ep 317/402* – «Наринэ», ООО «НАРЭКС».

Йогурт «Иммунеле» - *L. rhamnosus* и *L. casei*, йогурт «Актимель» - *L. casei DN-114001 defensis*, йогурт «Био Баланс» - *L. rhamnosus LGG ATCC 53103*, «Белая киска» - *L. casei*.

Музейные штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli M-17*, *Staphylococcus aureus N-3*, *Staphylococcus sp. 1 (S.albus)*, *Staphylococcus sp. 2 (S.citreus)*, гриб *Candida sp.*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella spp.*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri S-50* и *Shigella flexneri Rd* из коллекции кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО ИвГМА Минздравсоцразвития России, а так же *L. acidophilus NK 1 ГКНМ №175* (сер. 04 от 22.03.11) из коллекции ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии Г.Н. Габричевского.

Lentinus edodes (Шиитакэ) – штамм F 280, получен от Tim Straub, компания Pillsbury, Minnesota, USA. Гриб выращен в лабораторных условиях на субстрате из дубовых опилок с добавлением ячменя.

Метод биосовместимости лактобацилл. С этой целью использовали прямой метод биосовместимости при совместном культивировании на плотной питательной среде (Глушанова Н.А., 2005) в модификации (Рац. предл №2507, ИвГМА, 2012). Фламбирванный

стеклянный цилиндр погружали во взвесь микробной культуры, затем делали отпечаток на чашке со средой. Далее, отступив на 1-2 мм от ее края, делали отпечаток другой культуры. После подсыхания второго отпечатка чашки инкубировали при температуре 37⁰С в термостате. Биосовместимые культуры развивались совместно в наложенной части культуры.

Метод отсроченного антагонизма лактобацилл. Лактобациллы наносили на поверхность питательной среды, далее культивировали в оптимальных условиях в течение 24 часов. Затем условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, наносили на колонии лактобацилл, отступив от ее края на 1-2 мм. Результат учитывали по наличию признаков подавления или задержки роста чувствительной культуры в зоне совместного культивирования.

Метод микрокультивирования в стационарной камере диффузного типа. Способ сборки микрокамеры: 1. На тонкий слой «голодного» агара (6 x 1 мм), помещенного на покровное стерильное стекло, вносили исследуемую культуру. 2. После адгезии клеток поверхность накрывали вторым покровным стеклом меньшего размера. 3. Камеру с трех сторон окантовывали герметизирующей замазкой. 4. С помощью пастеровской пипетки в капиллярную щель между стеклами к слою агара с клетками подводили жидкий питательный бульон. По окончании заполнения камеры герметизирующей замазкой закрывали четвертую сторону микрокамеры.

Нефелометрический метод исследования. В работе использовали калориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2, предназначенный для измерений в диапазоне длины волн 315 – 980 нм, коэффициентов пропускания и оптической плотности жидкостных растворов и твердых тел, а также определения концентрации веществ в растворах.

Метод MALDI TOF. Масс-спектры MALDI TOF снимали на масс-спектрометре Shimadzu фирмы Biotech Axima в режиме положительных ионов с использованием в качестве матриц ДНВ (2,5-дигидроксибензойная кислота), СНСА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота).

Статистическую обработку результатов проводили с применением параметрических и непараметрических методов с помощью пакета статистических программ Excel (Windows 2007), Statistica 13, в частности, по t-критерию Стьюдента. Достоверность различий между средними показателями рассматривали как значимые при $p < 0,05$. Для вариационных рядов рассчитывали коэффициент вариации (CV) по формуле $CV = 100 * (\sigma / x_{cp}) \%$.

Определение наиболее информативного физиологического показателя развития клеток лактобацилл в различных условиях среды

В работе изучали физиологические свойства лактобацилл на клеточном, популяционном, а также видовом уровнях с использованием различных методов.

В начале работы методом микрокультивирования на клеточном уровне определили длину и диаметр лактобацилл в начале и конце клеточного цикла, а также время генерации клеток (τ). Установили, что наиболее информативным показателем развития лактобацилл является время генерации клеток. У культур выявили достоверные отличия τ клеток I поколения ($p < 0,001$); эти отличия носили несовпадающий характер как по значениям, так и по тенденциям изменений, вследствие чего использовать для характеристики популяции лактобацилл полученные данные не представлялось возможным. Значения времени генерации клеток II поколения были недостоверными. Это свидетельствует о том, что процессы, характеризующие развитие популяции клеток во II поколении, совпадали для различных штаммов, взятых в данный эксперимент. Таким образом, часто совпадающим и, следовательно, наиболее информативным по значениям параметром является τ клеток II поколения. Этот показатель, как критерий свойств лактобацилл, был использован в последующих исследованиях.

Оценка биосовместимости и антагонизма лактобацилл

В оптимальных условиях выполнены эксперименты по проверке биосовместимости и антагонизма на клеточном и видовом уровнях.

В ходе микрокультивирования на клеточном и популяционном уровне τ II поколения клеток штамма *L. acidophilus* не увеличилось под действием гриба рода *Candida* (таблица 1).

Таблица 1. Время генерации клеток *L. acidophilus* («Лактобактерин») при совместном микрокультивировании с условно-патогенной микробиотой

Штамм	№ эсп	I поколение			II поколение		
		τ (мин) среднее	ст. откл.	N_I	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_{II}
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		193±9	47	30	123±3	13,4	60
<i>L. acidophilus</i> + <i>Candida sp.</i>	1	165±7	36	29	120±3	25	55
	2	146±7	37	30	115±3	21	60
Достоверность	P	1-2 отличия не выявлены			1-2 отличия не выявлены		
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. aureus N-3</i>	1	190±8	43	30	125±4	30	56
	2	219±10	53	30	133±3	24	53
Достоверность	P	1-2 <0,05			1-2 отличия не выявлены		

Это свидетельствует, что культура *Candida sp.* не оказывала антагонистического влияния на развитие лактобацилл, т.е. они являются биосовместимыми. Вероятно, это связано с присутствием в кишечнике *Candida sp.* в норме (ОСТ 91500.11.0004–2003, норма до 10^3 КОЕ/мл).

Проведенные исследования антагонистической активности *S. aureus* N-3 показали, что τ лактобацилл незначительно увеличилось под действием выделяемых им ферментов (в пределах 10 минут). Следовательно, можно говорить о том, что штамм *S. aureus* N-3 слабо проявлял антагонизм в отношении исследуемой культуры *L. acidophilus*, поскольку не задерживал размножение клеток.

Далее изучили взаимоотношение между штаммами лактобацилл, взятых в эксперимент. Данные показали наличие высокой антагонистической активности штамма *L. rhamnosus* LGG в условиях микрокультивирования, в которых время генерации второго поколения *L. acidophilus* существенно увеличилось (с 123±3 минут в контроле, до 212±3 минут в опыте) (таблица 2).

Обнаружено различное антагонистическое действие штаммов *L. acidophilus* NK1 (123±3 - контроль, 161±4 минут - опыт), *L. rhamnosus* и *L. casei* (123±3 - контроль, 143±2 минут - опыт), а штамм *L. casei* DN-114001 *defensis* (123±3 - контроль, 129±2 минут - опыт) не оказывал влияние на размножение клеток тестируемого штамма *L. acidophilus*.

Таблица 2. Время генерации клеток *L. acidophilus* («Лактобактерин») при совместном микрокультивировании с другими штаммами лактобацилл

Штамм	I поколение				II поколение			
	τ (мин) среднее	ст. откл.	N _I	p	τ (мин) среднее	ст. откл.	N _{II}	P
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (контроль)	193±9	47	30		123±3	13	60	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i> LGG	247±7	39	27	<0,001	212±3	23	48	<0,001
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. casei</i> DN-114001 <i>defensis</i>	211±8	44	30	отличия не выявлены	129±2	14	58	<0,005
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> NK1	251±7	39	30	<0,001	161±4	27	60	<0,001
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i> и <i>L. casei</i>	178±9	52	30	отличия не выявлены	143±2	14	60	<0,001

Таким образом, установлено, что штаммы *L. acidophilus* и *L. casei* DN-114001 *defensis* являлись полностью биосовместимыми, и, следовательно, могут выращиваться совместно для получения пробиотического продукта. Статистические расчеты показали, что все изменения признака (τ для клеток изучаемого штамма *L. acidophilus*) достоверны. Экспериментальные результаты свидетельствуют, что метод совместного микрокультивирования с использованием

фазово-контрастной световой микроскопии позволяет быстро и количественно оценить наличие или отсутствие биосовместимости для изученных штаммов.

При культивировании лактобацилл очень важно оценить биосовместимость и антагонизм лактобацилл с отдельными представителями микробиоты кишечника человека. На популяционном уровне при изучении биосовместимости и антагонизма культур чашечным методом установлено, что *L. acidophilus* в большинстве случаев проявляет слабый антагонизм к использованным в работе тест-штаммам *Staphylococcus sp. 1*, *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Candida sp.* В тоже время штаммы *S.aureus N-3*, *Salmonella sp.*, *E.coli M-17* биосовместимы. Исключение составили *Staphylococcus sp. 2*, рост которого на чашке отсутствовал. Кроме того, обнаружено ингибирующее действие *Klebsiella sp.* на штамм *L. acidophilus*.

При использовании метода отсроченного антагонизма было обнаружено, что под влиянием экзометаболитов *L. acidophilus* ингибированию подвержены 7 из 9 штаммов (*Staphylococcus sp. 2*, *S.aureus N-3*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella sp.*, и *Escherichia coli M-17*), а устойчивость к метаболитам, выделяемым *L. acidophilus*, проявляли лишь *Staphylococcus sp. 1* и *Candida sp.*

Таким образом, классический чашечный метод в целом не всегда может показать, насколько культуры микроорганизмов биосовместимы или проявляют антагонизм в отношении друг друга. Поэтому использование метода микрокультивирования более информативно для оценки межвидовых взаимоотношений микроорганизмов при совместном культивировании.

Определение воздействия сока гриба Шиитаке на пробиотические штаммы лактобацилл

Для стимуляции роста и развития микроорганизмов при культивировании используют биологически активные вещества. Большое количество таких веществ присутствует в составе гриба *Lentinus edodes* (Шиитаке), однако информации относительно его действия на лактобациллы практически не имеется.

Методом микрокультивирования обнаружили, что под действием биологически активного вещества (сока) гриба Шиитаке τ второго поколения бактериальных клеток сократилось для *L. acidophilus* с 115 ± 3 до 103 ± 1 , *L. rhamnosus LGG* с 127 ± 3 до 120 ± 1 , *L. casei DN-114001 defensis* с 132 ± 2 до 120 ± 1 , *L. acidophilus NK1* с 159 ± 2 до 134 ± 2 , *L. rhamnosus* и *L. casei* с 143 ± 2 до 129 ± 1 минут. В среднем время генерации клеток лактобацилл сократилось на 10 % относительно контроля при добавлении сока гриба Шиитаке, что указывает на его стимулирующее действие.

На основании общепринятых бактериологических методик выделения лактобацилл на селективных питательных средах и всех выполненных экспериментов разработан и запатентован способ получения аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл.

Использование метода MALDI TOF для определения чистоты аутопробиотических комплексов лактобацилл

После выделения АПК лактобацилл или получения готового к применению препарата аутопробиотика необходимо определить его безопасность, определить чистоту комплекса. Для этой цели использован метод MALDI TOF с определением всего спектра макромолекул ($M_{ФМ}$) белков штаммов лактобацилл. Это позволило выполнить сравнительные исследования спектров $M_{ФМ}$, входящих в состав пробиотических препаратов лактобацилл, которые можно использовать для определения родовых признаков.

Установлено, что у родственников в исследованных парах детей в возрасте от 1 года до 5 лет наблюдалось совпадение пиков в спектре $M_{ФМ}$ для выделенного АПК на 49,9%. У взрослых родственников в возрасте 25 – 30 лет регистрировали снижение до 30,5%. Значения t-критерия Стьюдента для вариационных рядов было – 18,54 при $p < 0,05$. Поэтому, на наш взгляд, необходим индивидуальный подбор аутоштаммов лактобацилл для достижения максимального положительного эффекта при лечении и профилактике заболеваний ЖКТ, даже среди близких родственников.

Полученные данные открыли перспективу использования метода MALDI TOF для дальнейшего сравнительного анализа выделяемых АПК лактобацилл у генетически близких родственников разного возраста.

Влияние антимикробных факторов врожденного иммунитета на отдельные виды лактобацилл микробиоты человека

Общеизвестно, что при попадании клеток бактерий в новую среду обитания происходит активная физиологическая перестройка популяции и последующая элиминация нежизнеспособных клеток. Необходимость понимания механизмов действия гуморальных факторов врожденного иммунитета, содержащихся в слюне человека, является крайне важной и необходимой задачей для дальнейшего получения чистых культур лактобацилл.

Результаты экспериментов показали, что при добавлении в питательную среду слюны человека существенного увеличения τ второго поколения не происходило (таблица 3). Лишь для *L. acidophilus NK1* этот показатель сократился с 159 ± 2 мин. до 118 ± 1 мин. (на 41 минуту), различия были статистически достоверны ($p < 0,05$).

Однако внесение комплемента (К) в среду со слюной существенно изменило время генерации клеток. Для *L. rhamnosus LGG* и *L. casei DN-114001 defensis* время генерации клеток

второго поколения увеличилось почти на час (64 и 56 мин., соответственно – $p < 0,001$), для *L. acidophilus* на 34 мин. ($p < 0,001$), *L. rhamnosus* и *L. casei* на 19 мин. ($p < 0,001$), а *L. acidophilus* NK1 так же, как и в случае с добавлением только слюны, время деления клеток сократилось в среднем на 6 мин. ($p < 0,01$).

На основании проведенных экспериментов можно сделать заключение, что чувствительность каждого штамма лактобацилл к антимикробным факторам слюны является индивидуальным свойством.

Таблица 3. Время генерации клеток лактобацилл при микрокультивировании с добавлением антимикробных факторов слюны

Штамм	I поколение				II поколение			
	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_I	P	τ (мин) среднее	ст. откл.	N_{II}	p
<i>Lactobacillus acidophilus</i> * (контроль)	269±9	46,1	28	-	115±3	20	50	-
*+ слюна	193±9	47	30	<0,05	123±3	13	60	>0,05
*+слюна + К	224±6	35	30	<0,05	149±1	9	60	<0,05
<i>L.rhamnosus</i> LGG*	155±10	52,1	29	-	127±3	15	58	-
*+слюна	198±8	43	29	<0,05	131±2	16	58	>0,05
*+слюна + К	259±10	59	30	<0,05	191±2	14	58	<0,05
<i>L.casei</i> DN-114001 <i>defensis</i> *	89±6	35	30	-	132±2	14	60	-
*+слюна	181±5	28	30	<0,05	144±9	17	56	>0,05
*+слюна + К	236±7	37	30	< 0,05	188±2	16	60	<0,05
<i>L.acidophilus</i> NK1*	201±8	44	30	-	159±2	12	56	-
*+слюна	153±4	15	29	<0,05	118±1	6	50	<0,05
*+слюна + К	167±3	14	30	<0,05	153±1	10	60	<0,05
<i>L. rhamnosus</i> и <i>L. casei</i> *	176±9	52	30	-	143±2	14	60	-
*+слюна	264±8	46	30	<0,05	154±1	10	54	<0,05
*+слюна + К	174±3	14	30	>0,05	164±1	10	60	<0,05

*+Слюна – добавление антимикробных факторов слюны к изучаемым штаммам лактобацилл

*+Слюна + К - - добавление антимикробных факторов слюны с добавлением компонента к изучаемым штаммам лактобацилл

С помощью метода нефелометрического анализа обнаружено, что в популяции лактобацилл после обработки слюной, а также слюной и К одновременно, происходила активная элиминация части бактериальных клеток (таблица 4).

На основании результатов нефелометрии можно сделать вывод о возможности быстрого индивидуального подбора пробиотических штаммов лактобацилл при использовании слюны конкретного индивидуума. Однако остается открытым вопрос о степени соответствия лактобацилл для конкретного индивидуума и других людей.

Таблица 4. Коэффициент пропускания клеток лактобацилл нефелометрическим методом с добавлением антимикробных факторов слюны

Штамм	Время	*+Слюна		*+Слюна + К	
		коэффициент пропускания	процент изменения	коэффициент пропускания	процент изменения
<i>L. acidophilus*</i> (контроль)	0 ч.	72	0	72	0
	1 ч.	75	4,2±4	68	5,9±3
	2 ч.	69	8,7±7	64	6,3±5
	3 ч.	60	13±4	63	1,6±2
<i>L. rhamnosus LGG*</i>	0 ч.	59	0	56	0
	1 ч.	55	7,3±3	53	5,7±7
	2 ч.	43	27,9±2	44	20,5±4
	3 ч.	33	30,3±3	39	12,8±5
<i>L. casei DN-114001 defensis*</i>	0 ч.	67	0	67	0
	1 ч.	70	4,2±5	72	7,1±4
	2 ч.	77	9,1±3	75	4±7
	3 ч.	79	2,5±8	81	7,4±3
<i>L. acidophilus NK1*</i>	0 ч.	69	0	68	0
	1 ч.	73	5,5±6	65	4,6±1
	2 ч.	70	4,3±4	62	4,8±3
	3 ч.	67	4,5±3	60	3,3±5
<i>L. rhamnosus u</i> <i>L. casei*</i>	0 ч.	70	0	68	0
	1 ч.	69	1,4±3	63	8,3±6
	2 ч.	67	2,9±7	59	6,8±5
	3 ч.	62	8,1±2	55	7,3±2

*+Слюна – добавление антимикробных факторов слюны к изучаемым штаммам лактобацилл

*+Слюна + К – добавление антимикробных факторов слюны с добавлением комплемента к изучаемым штаммам лактобацилл

Для оценки физиологического состояния лактобацилл использовали слюну родных сестер и/или братьев и постороннего (генетически чужого) человека. В экспериментах было установлено, что коэффициент корреляции развивающихся популяций клеток при добавлении слюны родственников превалировала сильная и очень сильная связь между признаками, приближенная к единице (рис. 1). Однако встречалась и отрицательная корреляция - 3 значения из 20 (очень слабая связь). При действии слюны генетически неродственного человека на эти же штаммы лактобацилл чаще всего встречалась умеренная и значительная связь между признаками, а также отрицательная - 6 значений из 20 (рис. 2).

Положительная адаптивная реакция популяций в данном случае – это активное размножение клеток популяций лактобацилл для каждого индивидуума в исследуемой паре. Отрицательная адаптивная реакция популяций – это гибель клеток популяций лактобацилл для каждого индивидуума в исследуемой паре.

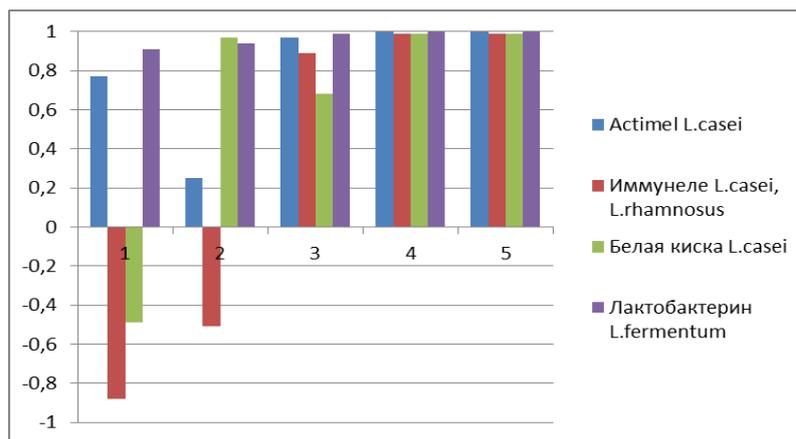


Рисунок 1. Коэффициент корреляции для развивающихся культур лактобацилл при добавлении в среду культивирования слюны 5 пар генетически близких родственников

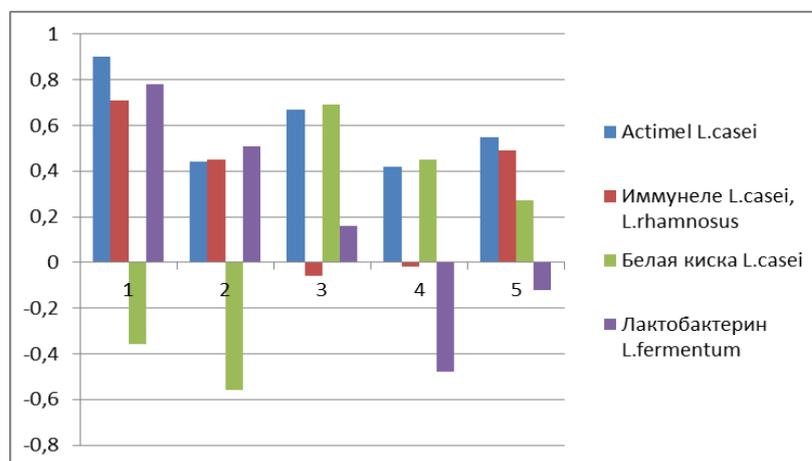


Рисунок 2. Коэффициент корреляции для развивающихся культур лактобацилл при добавлении слюны 5 пар генетически чужих людей

Высокий коэффициент корреляции позволил сделать вывод об одинаковых физиологических структурных перестройках у использованных штаммов лактобацилл под действием антимикробных факторов слюны у близких родственников на временном промежутке в 3 часа. Низкий коэффициент корреляции для генетически неродственных людей свидетельствовал о непредсказуемой адаптивной реакции клеток популяций лактобацилл. Это выражалось в разнонаправленном процессе развития и гибели клеток.

Таким образом, на основании всех представленных данных можно утверждать, что антимикробные факторы слюны близких родственников оказывают однотипное физиологическое действие на лактобациллы. В данном случае комплекс антимикробных факторов слюны близких родственников совпадает с эффекторным компонентом слюны (IgA), что является прямым подтверждением существования «иммунологического фильтра».

Сохранение и масштабирование аутопробиотического комплекса лактобацилл

После получения АПК лактобацилл и определения безопасности его применения существует необходимость в сохранении жизнеспособности бактерий, а также в быстром накоплении биологической массы. Для этого АПК разливали по ампулам в равном объеме (1 мл) и количестве микроорганизмов (титр не менее 10^7 КОЕ/мл), а затем замораживали (-20°C) для приостановки физиологических процессов на определенное время. Далее с целью получения готового молочнокислого продукта с содержанием АПК конкретного индивидуума содержимое одной из ампул (3% от объема молока) помещали в необходимый объем молока без предварительного размораживания и инкубировали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 – 48 ч для накопления необходимого объема биомассы АПК лактобацилл.

Установлено, что данный АПК содержал живые лактобациллы без потери их жизнеспособности (не менее 2-х лет), исходя из динамики изменения оптической плотности (D) нефелометрическим методом через 24 и 48 ч культивирования ($D = 0,26 \pm 0,03$ и $D = 1,11 \pm 0,01$, соответственно $p < 0,05$) (таблица 5).

Таблица 5. Влияние времени криоконсервирования при минус 20°C на развитие АПК при оценке нефелометрическим методом

Время криоконсервации	Оптическая плотность D (n=10)		Кратность изменения средних величин D		
	Время культивирования				
	24 ч	48 ч	24/0 ч	48/0 ч	48/24 ч
0 мес. (контроль)	$0,29 \pm 0,02$	-	24/0 ч	48/0 ч	48/24 ч
3 мес.	$0,30 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,02$	1,04	4,69	4,50
6 мес.	$0,29 \pm 0,01$	$1,39 \pm 0,02$	0,99	4,48	4,83
9 мес.	$0,28 \pm 0,01$	$1,30 \pm 0,01$	0,96	4,51	4,68
12 мес.	$0,28 \pm 0,01$	$1,23 \pm 0,01$	0,95	4,24	4,44
24 мес.	$0,26 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,01$	0,88	3,85	4,36

Данные этих экспериментов показали возможность быстрого, надежного и экономически мало затратного процесса накопления необходимой биомассы при получении готового продукта с высокой концентрацией клеток лактобацилл (более 10^7 КОЕ/мл). Длительное хранение лактобацилл в доступных условиях криоконсервации (-20°C) без потери их жизнеспособности и активности в перспективе может обеспечить возможность создания индивидуального криобанка АПК лактобацилл с быстрым получением необходимого количества продуктов функционального питания для дальнейшего применения.

Влияние натуральных биологически активных веществ лекарственного гриба Шиитаке на развитие лактобацилл

При пероральном введении готового аутопробиотика находящиеся в нем живые лактобациллы должны пройти такие барьеры, как желудочный сок и содержание желчи в тонком кишечнике. Поэтому для повышения выживаемости, стимуляции роста и развития лактобацилл на популяционном уровне нами успешно апробированы природные активные добавки высшего гриба Шиитаке.

В экспериментах в качестве стимулятора роста лактобацилл использовали стерильный натуральный сок и порошок в объеме 2,5% от объема питательной среды. Процент увеличения КОЕ/мл *L. acidophilus* с добавлением сока по сравнению с контролем составил 39,7 %, а с порошком – 46,2 %. Полученные результаты по стимулирующему действию производных гриба Шиитаке (сок, порошок) на лактобациллы явились основой нашего патента РФ №2661737.

Регистрацию изменений оптической плотности популяции клеток лактобацилл, входящих в состав АПК, при добавлении сока гриба Шиитаке проводили методом нефелометрии. Данные экспериментов показали увеличение оптической плотности в опыте относительно контроля в 2,5 раза ($p < 0,05$): контроль — $0,62 \pm 0,02$, опыт — $1,52 \pm 0,04$. Таким образом, увеличение числа клеток лактобацилл из состава АПК свидетельствует о стимуляции размножения микробных популяций.

Выводы

1. Установлено, что в оптимальных условиях микрокультивирования лактобацилл наиболее информативным показателем физиологического состояния их популяции являлось время генерации второго поколения клеток.

2. Показано, что кроме антагонизма по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, производственный штамм *L. acidophilus* в условиях совместного микрокультивирования лактобацилл обладал биосовместимостью с *L. casei DN-114001 defensis*, а также антагонистическим действием на *L. rhamnosus LGG* (увеличение времени второй генерации клеток на 100 мин).

3. Выявлено, что защитные антимикробные факторы слюны у генетически близких родственников оказывали на лактобациллы статистически равнозначное влияние, а у не состоявших в родстве людей отмечена коррелятивная связь показателей низкого уровня.

4. Впервые разработан приоритетный способ получения аутопробиотического комплекса, содержащего аутоштаммы лактобацилл человека.

5. Метод MALDI TOF рекомендуется использовать как референсный экспресс-метод оценки чистоты аутопробиотических комплексов лактобацилл.

6. Впервые установлен стимулирующий эффект (до 46,2%) гриба Шиитаке (*Lentinus edodes F280*) в отношении роста культур аутопробиотического комплекса лактобацилл.

7. Установлено, что использование криоконсервации аутопробиотического комплекса лактобацилл при минус 20°C позволяет сохранить жизнеспособность лактобацилл в течение двух лет (срок наблюдения).

Практические рекомендации

Определение межвидовой биосовместимости штаммов лактобацилл, а также их устойчивости к антимикробным факторам слюны, должно являться необходимым требованием при использовании этих штаммов для производства пробиотических продуктов и препаратов.

Предложенный способ получения аутопробиотического комплекса может быть использован для получения молочнокислых продуктов индивидуального потребления для коррекции дисбактериоза кишечника.

Биологически активные компоненты гриба Шиитаке (сока и порошка) могут быть использованы для роста и развития пробиотических и аутопробиотических штаммов лактобацилл.

Доступное замораживание (-20°C) аутопробиотического комплекса может обеспечить возможность создания и хранения индивидуального криобанка лактобацилл с быстрым получением необходимого количества биомассы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК – аутопробиотический комплекс

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колонии образующие единицы

М_{ФМ} – молекулярная масса фрагментов макромолекул

К — комплемент

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1.** Сафонова, М. А. Влияние конструктивных особенностей микрокамер на адаптивное поведение бактериальных клеток при образовании микроколоний / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // 75-итоговая студенческая научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 80-летию со дня рождения академика Б.С. Гракова. – Красноярск, 2011. – С. 148–149.
- 2.** Сафонова, М. А. Оценка информативности показателей развития бактериальных клеток при микрокультивировании / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // Материалы 91-й ежегодной научно-практической конференции студентов и молодых ученых ИвГМА «Неделя науки – 2011». – Иваново, 2011. – С. 114.
- 3.** Сафонова, М. А. Пробиотические препараты для коррекции микробиологических нарушений кишечника / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // **Вестник Ивановской медицинской академии.** – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 49–54.
- 4.** Сафонова, М. А. Совершенствование метода микрокультивирования бактерий в оценке особенностей развития их популяции / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // **Вестник Ивановской медицинской академии.** – 2012. – Т. 17, № 2. – С. 16–20.
- 5.** Сафонова, М. А. Физиологическая устойчивость клеток бактерий из популяций нормофлоры человека к факторам неспецифической защиты / М. А. Сафонова // Материалы VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых // Вестн. РГМУ. – 2012. – № 1, спец. вып. – С. 301–302.
- 6.** Сафонова, М. А. Микрокультивирование клеток на начальных этапах развития бактериальной популяции / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // Итоговая Всероссийская студенческая научная конференция с международным участием «Гатянин день». – М., 2012. – С. 123–124.
- 7.** Сафонова, М. А. Биосовместимость и антагонизм пробиотических лактобацилл в отношении отдельных представителей микрофлоры кишечника / М. А. Сафонова // II Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» с международным участием. – Барнаул, 2012. – С. 61–63.
- 8.** Сафонова, М. А. Антагонизм пробиотических лактобацилл в отношении определенных представителей микрофлоры кишечника / М. А. Сафонова // Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» : матер конф. – Иваново, 2012. – С. 105.

- 9. Сафонова, М. А.** Оценка биосовместимости микробных культур методом микрокультивирования / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XV Кашкинские чтения), с международным участием : тез. докл. // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14. - № 2. – С. 126–127.
- 10. Сафонова, М. А.** Использование комплекса аутоштаммов бифидобактерий и лактобацилл в коррекции дисбактериозов / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // Биология – наука XXI века : матер. Междунар. конф. / под ред. Р. Г. Василова. – М. : МАКС Пресс, 2012. – С. 817–818.
- 11. Сафонова, М. А.** Биосовместимость пробиотических штаммов лактобацилл / М.А. Сафонова, О.Ю. Кузнецов // XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», посвященная 30-летию научно-образовательного центра ИБХ РАН : тез. докл. – М., 2013. – Т. 2. – С. 79.
- 12. Сафонова, М. А.** Влияние сока гриба на пробиотические штаммы лактобацилл / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XV Кашкинские чтения), с международным участием : тез. докл. // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 119.
- 13.** Способ получения аутопробиотика, содержащего живые лактобациллы и бифидобактерии. Патент № 2505304 РФ ; МПК51 А61К 35/74, А23С 9/127. / Кузнецов О. Ю., Кузнецова Л. А., Кузнецов А. О., Борисова Е. М., Сафонова М. А.; патентообладатель Кузнецов Олег Ювенальевич; заявл. 22.06.2010; опубл. 27.01.2014. Бюл. № 3. – 7 с.
- 14. Кириленко, М. А.** Создание аутопробиотического препарата, содержащего активный комплекс бифидобактерий и лактобацилл / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // Международный научно-исследовательский журн. – 2015. – № 10 (41), ч. 4, ноябрь. – С. 61–62.
- 15. Кириленко, М. А.** Использование метода оценки биосовместимости и антагонизма бактерий и грибов представителей микрофлоры человека / М. А. Кириленко // VI Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015»: тез. – СПб., 2015.– С. 178.
- 16. Кириленко, М. А.** Влияние неспецифических факторов защиты близких родственников на развитие лактобацилл / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // XII областной фестиваль «Молодые ученые – развитию Ивановской области»: Межрегион. науч. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием. – Иваново, 2016. – Т. 1. – С. 317–318.

- 17. Кириленко М.А.** Дисбактериоз кишечника. Причины, симптомы, современная диагностика и эффективное лечение / М.А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // Учебное пособие для студентов, обучающихся по специальностям «Лечебное дело» и «Педиатрия». - Иваново, 2016. – 66 с.
- 18. Кириленко, М. А.** Использование метода MALDI-TOF-MS для экспресс-оценки качества аутопробиотического препарата / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // XIII областной фестиваль «Молодые ученые – развитию Ивановской области»: III Всерос. образоват.-науч. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека». – Иваново, 2017. – Т. 1. – С. 355–356.
- 19. Кириленко, М. А.** Получение аутопробиотического продукта на основе лактобацилл / М. А. Кириленко, Ж. М. Дмитриева, О. Ю. Кузнецов // Материалы III Национального конгресса бактериологов в рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП) // Бактериология. – 2017. – Т. 2. - № 3. – С. 68.
- 20. Кириленко, М. А.** Микрокультивирование лактобацилл как способ оценки их биосовместимости / М. А. Кириленко, А. Е. Еронина, О. Ю. Кузнецов // Материалы III Национального конгресса бактериологов в рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП) // Бактериология. – 2017. – Т. 2. - № 3. – С. 68.
- 21. Кириленко, М. А.** Использование метода MALDI TOF для сертификационного контроля молочнокислого продукта на основе живых аутопробиотических микроорганизмов / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // Материалы III Национального конгресса бактериологов в рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП) // Бактериология. – 2017. – Т. 2. - № 3. – С. 68–69.
- 22. Кириленко, М. А.** Масштабирование процесса приготовления молочнокислого аутопробиотического продукта / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // Материалы III Национального конгресса бактериологов в рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП) // Бактериология. – 2017. – Т. 2. - № 3. – С. 69.
- 23. Кириленко М. А.** Выбор оптимальной матрицы для оценки масс-спектров аутопробиотического комплекса лактобацилл / М. А. Кириленко, Ж. М. Дмитриева, К. М. Литов, О. Ю. Кузнецов // IV Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых

с международным участием. «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека»: матер. конф. – Иваново, 2018. – С. 371–373.

24. Способ получения препарата эубиотика Лактобактерин. Пат. 2661737 РФ. МПК51 А61К 35/74. / **Кириленко М. А.**, Кузнецов О. Ю.; патентообладатель ФГБОУ ВО «Ивановская государственная академия» Минздрава России; заявл. 17.07.2017; опубл. 19.07.2018. Бюл. № 20. – 4 с.

25. **Кириленко, М. А.** Сравнение аутопробиотических комплексов лактобацилл у генетически близких родственников и возможность их использования / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов, К. М. Литов // **Вестник Ивановской медицинской академии.** – 2018. – Т. 23. - № 1. – С. 26–29.

26. **Кириленко, М. А.** Влияние криоконсервации на выживаемость комплекса аутошаммов лактобацилл при хранении и процессах биотехнологического масштабирования / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов, Ж.М. Дмитриева // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.** – 2019. – Т. 15. - № 2. - С. 5 – 10.

27. **Кириленко, М. А.** Влияние реологических условий среды на адаптивное поведение лактобацилл в процессе микрокультивирования / М. А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2019. – Т. 168. - № 11. – С. 607 – 610.

28. **Кириленко, М. А.** Оценка биологического действия фармакологических форм шиитаке (*Lentinus edodes*) на лактобактерии / М.А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов // **Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология».** – 2019. – Т. 28. – С. 56 – 62.

29. **Kirilenko, M. A.** Effect of rheological conditions of the environment on adaptive behavior of lactobacilli in microculture / Kirilenko, M.A., Kuznetsov, O.Yu. // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2020. – Т. 168. - № 5. – С. 662 – 664.

30. **Кириленко, М. А.** Влияние кислотности среды на жизнеспособность пробиотических лактобацилл / М.А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов, А.П. Калмыкова // XVII Областной фестиваль «молодые ученые – развитию ивановской области» VII Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека». – 2021. – С. 188 – 190.

31. **Кириленко М. А.**, Микрокультивирование клеток лактобацилл в оптимальных условиях среды / М.А. Кириленко, О. Ю. Кузнецов, // XVII Областной фестиваль «молодые ученые – развитию ивановской области» VII Всероссийская научная конференция студентов и

молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека». – 2021. – С. 190 – 192.

Примечание: Сафонова М. А. = Кириленко М. А.