

ЛЕВ

Игорь Олегович

**ПОИСК НОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-АНТАГОНИСТОВ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАНДИДОЗОВ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ
АНТИМИКОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03– микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Оболенск-2017

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научные руководители:

Похиленко Виктор Данилович, доктор технических наук, старший научный сотрудник

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Вайнштейн Михаил Борисович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» РАН, г. Пущино-на-Оке, заместитель директора по научной работе

Логинов Олег Николаевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Уфимский Институт биологии» РАН, г. Уфа, заведующий лабораторией биотехнологий

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора РФ, г. Москва

Защита состоится «__» декабря 2017 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. №1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рост распространенности микотических инфекций представляет собой серьезную проблему медицинского и научного характера. По оценкам экспертов микозами страдает 10-20% взрослого населения и до 50% людей в возрастной группе 70 и более лет [Котрехова, Разнатовский, 2005]. Способствует этому ряд причин, таких как возрастание в популяции лиц с иммуносупрессией и иммунодефицитными состояниями, вызванных широким спектром заболеваний, таких как хронические бактериальные и вирусные инфекции, СПИД, а также атопическими состояниями и длительными стероидными терапиями. Также сыграло свою роль ухудшение экологической обстановки, материальных и социальных условий, что привело к росту фоновых соматических заболеваний, способствующих развитию микозов [Gill, Marks, 1999].

Остро стоит проблема устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам. Исходная устойчивость является, как правило, видовой характеристикой, или встречается у части штаммов вида, остальные штаммы которого чувствительны к препарату. Приобретенная устойчивость развивается во время лечения препаратом у штаммов изначально чувствительных к нему, и это является одной из основных причин неэффективности антимикотической терапии. Причиной приобретенной устойчивости являются мутации грибов, приводящие к появлению и отбору штаммов с необычно высокой минимально подавляющей концентрацией [Веселов, 2007, Abu-Elteen, 2012, Sardi et al., 2013].

Кроме того, использование против микозов в обычных терапевтических дозах наиболее эффективных в настоящий момент препаратов, таких как амфотерицин В, кетоконазол (низорал), флуконазол и др., часто вызывает побочные эффекты в виде озноба, лихорадки, головной боли, тошноты, рвоты (особенно при первых приемах). Возможны также мышечные боли, судороги, падение артериального давления, кишечные кровотечения, загридинные боли. Помимо общих желудочно-кишечных расстройств, установлено также токсическое действие имеющихся на рынке антимикотических препаратов на другие органы и системы. Это гепатотоксичность, которая характеризуется транзиторным повышением уровня трансаминаз и щелочной фосфатазы, миелотоксичность (в виде гемолиза, анемии и тромбоцитопении), нефротоксичность (развитие интерстициального нефрита, табулярного ацидоза и повышение уровня мочевины, остаточного азота и креатинина в сыворотке крови). Эти побочные эффекты требуют проведения профилактических мероприятий или даже отмены препарата, что часто делает лечение малоэффективным или не эффективным вообще [Сергеев, Сергеев, 2003].

Все это в совокупности делает необходимой дальнейшую разработку новых и безопасных средств борьбы с опасными микроорганизмами, и в частности, грибными патогенами, из которых наибольшее распространение получили дерматомицеты рода *Candida* [Сергеев, Сергеев, 2001, Sardi et al., 2013].

Степень разработанности темы исследования

Разработка антимикотических препаратов активно ведется в последние десятилетия во многих странах. Тем не менее, распространенность грибных инфекций продолжает возрастать, и эта проблема требует дополнительных исследований и разработок. Биологическое разнообразие организмов остается еще мало использованным ресурсом, и одним из решений задачи разработки новых антимикотических средств является поиск и выделение продуцентов из природных ниш, отличающихся высокой конкуренцией в биоценозе. В этом ключе, все

большой интерес представляют бактерии семейства *Bacillaceae*, способные синтезировать широкий спектр разнообразных соединений, в том числе антибактериальных и антимикотических, и хорошо зарекомендовавшие себя как технологичные промышленные продуценты [Акуганов и др., 2012]. В практическом здравоохранении все шире находят применение препараты на основе живых культур бактерий и их метаболитов, которые способны контролировать болезни человека и животных. Помимо препаратов на основе нормофлоры (например, бактисубтил, бификол, линекс), восстанавливающих микробиоту кишечника и содержащих такие микроорганизмы, как *Bacillus cereus* sp. штамм IP 5832, *Lactobacillus acidophilus* и др., применяются такие средства как коредон - биофармацевтический препарат на основе живой культуры *Bacillus subtilis* для лечения бактериальной, вирусной инфекции и иммунодефицитного состояния.

В отделе биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ накоплен опыт разработки антимикробных препаратов, и создана рабочая коллекция микроорганизмов, в том числе бацилл, выделенных из различных конкурентных экологических ниш, а также из бедных и эррозионных минеральных пород, ризосферной зоны растений, где особенно велика доля микроорганизмов-антагонистов [Дунайцев, 2010]. Уже первичный скрининг активности таких микроорганизмов в отношении широкого спектра бактериальных и грибных патогенов показал перспективность селекции промышленно значимых продуцентов и создания препаратов с использованием компонентов, обеспечивающих антагонистическую активность.

Цель исследования - поиск новых бактериальных штаммов, обладающих выраженной антагонистической активностью в отношении наиболее распространенных возбудителей кандидозов, изучение их биологических свойств и природы антагонистической активности, а также разработка на их основе антимикотических биопрепаратов.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг бактериальных штаммов-антагонистов из рабочей коллекции отдела биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ на наличие антимикотической активности с целью отбора перспективного продуцента против грибных патогенов, в том числе дерматомицетов рода *Candida*.

2. Изучить культурально-морфологические и биохимические свойства, таксономическую принадлежность отобранного штамма. Проверить выбранный штамм на безопасность для теплокровных.

3. Исследовать влияние параметров культивирования выбранного штамма на его рост и биосинтез антимикотических соединений.

4. Выявить факторы, ответственные за антимикотическую активность выбранного штамма. Выделить и очистить активные метаболиты штамма, изучить их физико-химические, биологические свойства, провести исследования по определению их структуры.

5. Изучить эффективность прототипа биопрепарата против кандидоза на основе активных метаболитов в опытах на животных.

6. Разработать на основе живой культуры штамма-продуцента прототип биопрепарата и испытать его активность.

Научная новизна

Отобран новый бактериальный штамм, проявляющий высокую активность в отношении грибных патогенов человека и животных. Впервые показано, что культура *Bacillus mojavensis* синтезирует антимикробные вещества класса аминогликозидов. Впервые обнаружена

продукция бактериями рода *Bacillus* аминокликозида с молекулярной массой свыше 600 Да. Показана эффективность использования препарата на основе антимикотического вещества штамма *B. mojavensis* для лечения кандидоза ротовой полости у мышей. Доказана эффективность использования антагонистических свойств *B. mojavensis* в отношении фитопатогенных грибов, в том числе возбудителя снежной плесени *Microdochium nivale*.

Практическая значимость и внедрение результатов

Отобран активный штамм Lhv-97 с антимикробными свойствами и депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов «ГКПМ - Оболенск» под номером В-8101 как *Bacillus mojavensis* (свидетельство о депонировании №45 от 26 июня 2017). Подана заявка о выдаче патента на штамм *B. mojavensis* (Федеральный уровень внедрения).

Оптимизирован биосинтез антимикотических соединений выбранным штаммом-продуцентом. Разработан способ выделения и очистки антимикотических метаболитов, позволяющий получить препарат со степенью очистки не менее 95 %. Разработан Лабораторный регламент ЛР 78095326-188-2017 на получение антимикотического комплекса АМВ-97. Показана возможность использования прототипа препарата на основе АМВ-97 против кандидоза ротовой полости.

Продуцент использован в разработке прототипа препарата на основе живой культуры. Результаты независимых полевых испытаний на пшенице в 2013 г. на базе Рязанского НИИ СХ и в 2015 г. на базе РГАУ им. П.А. Костычева экспериментальных образцов биопрепарата на основе штамма Lhv-97 в качестве альтернативы применению химических фунгицидов оформлены актами производственных испытаний, утвержденными руководителями указанных организаций (Межучрежденческий уровень внедрения).

Методология и методы исследования

Методология исследований соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования явился поиск нового природного штамма-антагониста грибных патогенов и разработка прототипов препаратов на его основе.

Штаммы микроорганизмов. Для поиска активного штамма-антагониста использовали коллекцию фосфатрастворяющих микроорганизмов (ФРМ), состоящую из более 700 бактериальных и грибных изолятов, созданную на базе ФБУН ГНЦ ПМБ отделом биологических технологий. У отобранного перспективного изолята изучили культурально-морфологические и биохимические свойства. Штамм Lhv-97 идентифицировали с помощью общепринятых микробиологических методов, биохимических тестов Enterotest, Nefermtest (Lachema, Чехия), API 50 CH (Biomerieux, Франция) и прилагаемых к ним каталогов/программ идентификации, а также с помощью MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) и биологического анализатора Vitek-2 (Biomerieux, France) с использованием кассет Vitek 2 GP и Vitek 2 ANC для видоидентификации грамположительных и сложнокультивируемых микроорганизмов. Для видоидентификации использовали также генотипирование по последовательности гена 16S-субъединицы рибосомальной РНК. Для определения антагонистической активности ФРМ, и в частности штамма Lhv-97, в качестве тест-объектов использовали 35 штаммов патогенных грибов, относящихся к родам *Candida*, *Trichophyton*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, и 27 штаммов бактериальных патогенов родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Xantomonas*, *Erwinia* и других.

Микробиологические методы. Штаммы грибов выращивали на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в течение 5÷7 суток при 28 °С. Штаммы ФРМ культивировали на чашках Петри с

МПА и ГРМ-агаром (производства ФБУН ГНЦ ПМБ «Питательные среды», п. Оболенск) при температуре 28 °С в течение двух суток. Патогены человека и животных выращивали при температуре 37 °С в течение суток. Глубинное культивирование проводили во встряхиваемых колбах на обедненных и минеральных средах.

Для определения антагонистических свойств Lhv-97 использовали методы встречных культур, диффузии в агар, метод минимальных ингибирующих и бактерицидных концентраций (МИК).

Биотехнологические методы. Посевную культуру штамма Lhv-97 выращивали в колбах на термостатируемой качалке IRC-1-U Adolf Kunner G (Швейцария). Процесс культивирования вели в ферментере Sartorius Biostat B-plus (Германия) с рабочим объёмом 8 л. Для оптимизации питательных сред и условий культивирования использовали общепринятые методики подбора питательных сред и условий глубинного культивирования микроорганизмов. Разделение культуральной жидкости (КЖ) на клеточную массу и фугат осуществляли на центрифугах MiniSpin (Eppendorf, Германия) и J2-21C (Beckman Coulter Instruments, США). Полное отделение клеток от фугата и получение таким образом бесклеточного фильтрата (БФ) КЖ проводили на фильтрующих системах Corning 1L Filter System (Corning, США). Получение концентрата БФ КЖ (КБФ КЖ) проводили на вакуум-выпарной установке Laborota 4000 (Heidolph, Германия). Для получения прототипов лиофилизированного препарата на основе штамма Lhv-97 использовали сублимационную установку Virtis BenchTop-4k (США). Для получения образцов сухого препарата на основе действующего вещества штамма Lhv-97 использовали конвективную сушилку «Суховой» (Россия). Для получения липосом на основе действующего вещества штамма Lhv-97 использовали мини-экструдер (Avanti Polar Lipids, США).

Биохимические методы. Для определения биохимических свойств штамма Lhv-97 использовали мультисистемы Enterotest 24, Nefermtest 24 и API 50CH по стандартным инструкциям и программному обеспечению, прилагаемых к данным тестам фирмами-производителями. Устойчивость к антибиотикам определяли по зонам подавления роста штамма Lhv-97 дисками с антибиотиками.

Оценка безвредности штамма. Безвредность штамма Lhv-97 для животных, проверяли в экспериментах *in vivo* на беспородных белых мышах.

Физико-химические методы. Для исследования влияния физико-химических факторов на антимикробную активность штамма *Bacillus mojavensis* Lhv-97 изучали действие повышенной температуры на БФ КЖ, чувствительность к трипсину и протеиназе К, влияние процесса диализа.

Для разделения компонентов фильтрата КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 применяли обращенно-фазовую хроматографию низкого давления, жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ) с использованием колонки Phenomenex Jupiter C18 и детектора Bio-Rad BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, USA). Для дальнейшего разделения компонентов, предпочищенных с помощью ВЭЖХ, использовали метод эксклюзионной хроматографии низкого давления.

Определение молекулярной массы очищенного антимикотического вещества (АМВ) штамма Lhv-97 проводили с помощью жидкостного хромато-масс-спектрометра высокого разрешения OrbiTrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Germany). Точность измерения масс выше 5 ppm. Определение функциональных групп АМВ проводили с помощью газовой

хроматографии (ГХ) на хроматографе HP5890 (Hewlett-Packard, США) с использованием колонки с полидиметилсилоксановой фазой SPB-1 и пламенно-ионизационного детектора.

Исследование распределения по размерам липосом на основе действующего вещества штамма *B. mojavensis* Lhv-97 проводили с помощью лазерного гранулометра MicroTec Plus (Fritsch, Германия). Микрофотографии липосом получали с помощью оптического микроскопа Olympus BX41 (США) и атомно-силового микроскопа SmartSPM (AIST-NT, Россия).

Биологические методы. Изучение специфической эффективности *in vivo* препарата на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 проводили на мышинной модели кандидоза полости рта у мышей. В качестве модельных животных использовали мышей линии BALB/c с индуцированным иммунодефицитом.

Оценку эффективности применения экспериментальных образцов на основе штамма Lhv-97 в полевых условиях выполняли на базе ГНУ «Рязанский НИИ сельского хозяйства» и Рязанского Государственного Агротехнического университета им. П.А. Костычева на яровой и озимой мягкой пшенице. В экспериментах использовали основные методики и схемы, общепринятые в селекционных, научно-исследовательских учреждениях и при Государственном сортоиспытании.

Статистическая обработка результатов проводилась стандартными общепринятыми методами. Оценку разброса данных в экспериментах проводили подсчетом средних величин и среднего квадратичного отклонения для выявления доверительного интервала при 95%-ном уровне значимости. Для расчетов применяли программы STATISTICA и Excel.

Положения, выносимые на защиту

1. Вновь выделенный штамм *Bacillus mojavensis* Lhv-97 способен подавлять широкий спектр грибных и бактериальных возбудителей болезней человека, животных и растений.
2. Культура штамма *Bacillus mojavensis* Lhv-97 синтезирует антимикробный компонент класса аминогликозидов с молекулярной массой свыше 600 Да.
3. Прототип препарата на основе антимикотического метаболита штамма *Bacillus mojavensis* Lhv-97 может быть использован для лечения кандидозов у животных.
4. Прототип препарата на основе живой культуры *Bacillus mojavensis* Lhv-97 может обеспечить повышение урожайности растительных культур в полевых условиях, а также защиту от фитопатогенов, в том числе от возбудителей снежной плесени.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов подтверждается применением современных методов исследования и статистической обработкой данных, а также использованием оборудования, поверенного и сертифицированного надлежащим образом.

Материалы диссертации представлены на пяти российских и международных научных конференциях: Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVI Кашкинские чтения) (19 – 21 июня 2013 г., г. Санкт-Петербург); VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (8-10 апреля 2014 г., г. Москва); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора: «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь), на IX Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (13-15 марта 2017 г., г. Москва); 4 съезде микологов России (12-14 апреля 2017 г., г. Москва).

Работа выполнена в отделе биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках отраслевых программ: «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011-2015 гг.) и «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (на 2016-2020 гг.).

Тема диссертации была утверждена на заседании Ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ 19 июня 2013 г., протокол УС № 6.

Публикации. Основное содержание работы представлено в 14 научных публикациях, включая 6 статей в реферируемых научных журналах (в том числе 2 в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени), 1 патента Российской Федерации на изобретение и 1 поданной заявки на патент Российской Федерации.

Личный вклад соискателя. Аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по проблеме, а также все этапы экспериментальной работы (планирование, проведение исследований, обработка результатов и их интерпретация), включая: выделение активного штамма, исследование его основных свойств, таксономической принадлежности, подбор питательных сред и условий культивирования продуцента, изготовление на его основе экспериментальных образцов биопрепаратов, выделение и очистка антимикотического вещества, проведены самим соискателем или при его непосредственном участии.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 161 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 77 работ отечественных и 72 работы зарубежных авторов, и трех приложений. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 11 таблицами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск нового штамма-антагониста как потенциального продуцента антимикотических веществ

Из коллекции ФРМ на антагонистическую способность в отношении более 30 актуальных грибных возбудителей болезней человека, животных и растений проверили более 100 наиболее перспективных изолятов. Выборочные данные представлены на рисунке 1 и в таблице 1.

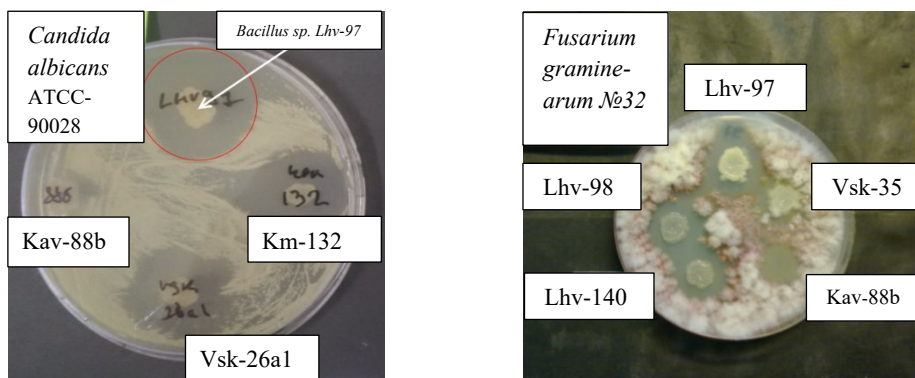


Рисунок 1 – Антагонистическая активность ФРМ в отношении *Candida albicans* ATCC-90028 и *Fusarium graminearum* №32

На основе полученных данных в качестве перспективного продуцента был выбран термотолерантный изолят Lhv-97 (№5 в табл. 1), как проявляющий самый высокий уровень антагонизма к грибным патогенам, в том числе дерматомицетов рода *Candida*.

Биологическая безопасность штамма Lhv-97 была показана в острых опытах на беспородных белых мышах. Все мыши, зараженные в дозах 1×10^{10} КОЕ, остались живы и не проявляли признаков интоксикации на протяжении всего срока наблюдения (14 суток).

Таблица 1 - Антагонистическая активность ФРМ по отношению к грибным патогенам человека, животных и растений.

№	Исследуемый штамм коллекции ФРМ	Антагонистическая активность по отношению к					
		<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. graminearum</i> №32	<i>F. culmorum</i> №23
1	<i>Acinetobacter sp.</i> Kav-305	0	0	+++	0	++	+++
2	<i>Bacillus sp.</i> Kav-88b	0	+	++	0	+++	++
3	<i>Pseudomonas sp.</i> Hor-7a	0	0	++	0	++	++
4	<i>Bacillus sp.</i> Km-132	++	+++	++	++++	+++	+++
5	<i>Bacillus sp.</i> Lhv-97	++++	++++	+++	++	+++	+++
6	<i>B. megaterium</i> Lhv-716	+	+	++	+	+++	+++
7	<i>B. megaterium</i> Lhv-98a	+	+	+++	++	+++	+++
8	<i>B. subtilis</i> Vsk- 26a1	++	+++	+++	+	+++	+++
9	<i>Candida lambica</i> Lev-16	0	0	+	0	+	+
10	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Lhv-47b	0	0	+	0	+	+
11	<i>Bacillus cereus</i> Vsk-35	0	0	++	0	++	++
12	<i>Bacillus sp.</i> Lhv-125a	0	0	+	0	+	+
13	<i>Klebsiella sp.</i> Kav-171	0	0	+	+++	++	++
14	<i>Pantoea agglomerans</i> Kav-170	0	0	+	0	+	+
15	<i>Pseudomonas sp.</i> Krl-181a	0	0	++	+	+++	++
16	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3	+++	+++	++	+++	+++	++

Примечания - 0 – отсутствие активности, «+» - минимальная активность «+++» - максимальная активность

Идентификация штамма Lhv-97

На основании изучения культурально-морфологических и биохимических свойств, а также по данным масс-спектрометрического исследования с помощью MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) изолят Lhv-97 определили как *Bacillus sp.* С целью видоидентификации штамма Lhv-97 был проведен генетический анализ участка гена 16S рРНК. Полученная в результате секвенирования по Сенгеру нуклеотидная последовательность исследуемого гена штамма Lhv-97 на 100 % соответствовала нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК девятнадцати штаммов вида *Bacillus toyovensis*. Таким образом, в результате комплекса из морфологических, биохимических, биофизического и генетического методов определения вида микроорганизма исследуемый штамм Lhv-97 был идентифицирован как *Bacillus toyovensis*.

Исследование активности штамма Lhv-97 в отношении патогенных для человека, животных и растений микроорганизмов

Штамм Lhv-97 проявляет антагонистическую активность против широкого видового спектра микроорганизмов: 27 штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий и

38 штаммов грибов. Штамм *B. mojavensis* Lhv-97 проявлял значительную антимикробную активность (ширина зон задержки роста патогенов от 10 до 36 мм) против представителей видов *Erwinia cancerogena*, *Haemophilus influenzae*, *Micrococcus luteus*, *Morganella morganii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*, но лучшие результаты были отмечены для представителей рода *Candida* – для 19 штаммов 3-х видов зона задержки роста составляла 25-43 мм.

Подбор эффективных условий культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97

При определении состава питательной среды для культивирования продуцента с целью определения наилучших условий антимикотической активности проводили проверку 6 индустриально применяемых источников углерода: глюкозы, глицерина, лактозы, сахарозы, мелассы и н-парафина. При этом в качестве источника азота и фосфора использовали $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в концентрации 3 г/л. Результаты представлены в таблице 2. Лучшие показатели зон подавления роста штамма *Candida albicans* ATCC-90028 были отмечены на средах с добавлением 5 г/л глюкозы и мелассы. Для дальнейших работ отобрана глюкоза, как наиболее стандартизированный источник углерода.

Таблица 2 - Результаты подбора источника углерода в среде

Источник углерода и его концентрация, г/л	Диаметр зоны подавления роста, мм	
	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019
глюкоза 0,25	31	27
глюкоза 0,5	19	26
сахароза 0,25	21	15
сахароза 0,5	19	15
лактоза 0,25	0	0
лактоза 0,5	0	0
меласса 0,25	15	15
меласса 0,5	33	27
глицерин 0,25	21	15
глицерин 0,5	23	15
парафин 0,25	0	0
парафин 0,5	0	0

Далее в составе среды подбирали источник азота (табл. 3). Культивирование проводили с учетом результатов первой серии опытов, то есть с добавлением глюкозы в рабочей концентрации 5 г/л. Концентрация атомарного азота в других исследуемых азотсодержащих веществах соответствовала количеству атомарного азота в составе фосфата аммония при концентрации 3 г/л. Лучшие результаты по величине зон подавления КЖ были получены при выращивании штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в присутствии двузамещенного фосфата аммония в качестве основного источника азота в концентрации 3 г/л (табл. 3).

Таблица 3 - Результаты подбора источника азота в среде

Состав среды	Диаметр зоны подавления роста, мм			
	<i>Candida albicans</i> ATCC-90028		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC-22019	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Ферментативный пептон 3 г/л	23	25	23	25
ГРМ 3,7 г/л	31	29	27	29
Казеин HiMedia 2,3 г/л	27	25	21	21
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 3 г/л	35	35	35	35
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 6 г/л	0	0	0	0
Картофельный отвар	35	35	35	35

Далее был проведен подбор температуры культивирования в интервале от 15 до 60 °С с интервалом в 5 °С с целью повышения продукции антимикотических метаболитов. Термотолерантный штамм *B. mojavensis* Lhv-97 культивировали в жидкой питательной среде с добавлением глюкозы и двузамещенного фосфата аммония. Как показано на рис. 2, продукция антимикотических метаболитов начиналась при 25 °С и заканчивалась при 45 °С. Эффективным температурным интервалом для синтеза антимикотических компонентов является температура 35-40 °С. В дальнейшем культивирование проводили при 37 °С.

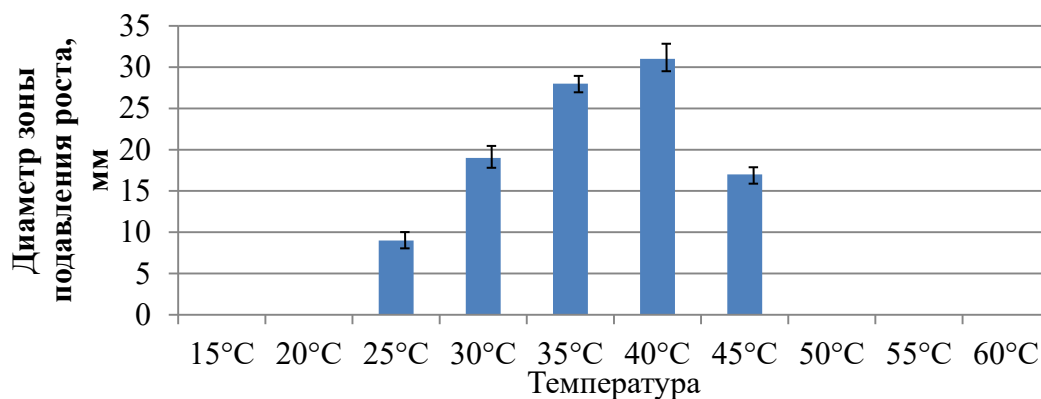


Рисунок 2 - Размеры зон подавления роста *C. albicans* ATCC-90028 КЖ, полученной культивированием штамма *B. mojavensis* Lhv-97 при разных температурах

Как возможный фактор улучшения роста и биосинтеза у бацилл, при культивировании был использован дрожжевой экстракт (ДЭ). Эффективную концентрацию ДЭ определяли в интервале 0,5 -1,5 г/л, что не сильно удорожает питательную среду. Культивирование проводили при 37 °С на питательной среде с глюкозой, двузамещенным фосфатом аммония и с тремя концентрациями ДЭ: 0,5, 1,0 и 1,5 г/л. Наибольшие зоны подавления полученной КЖ тест-штаммов рода *Candida* (27-29 мм) наблюдались при концентрации ДЭ - 1 г/л. При концентрации ДЭ - 1,5 г/л в питательной среде производство антифунгальных метаболитов штаммом *B. mojavensis* Lhv-97 прекращалось.

Изучали также динамику продукции антимикотических метаболитов в процессе ферментации на среде подобранного состава при 37 °С. Антимикотическая активность КЖ начинала расти после 4 часов культивирования, и наибольшее значение было отмечено при 12 ч роста, после чего активность равномерно снижалась (рис. 3).

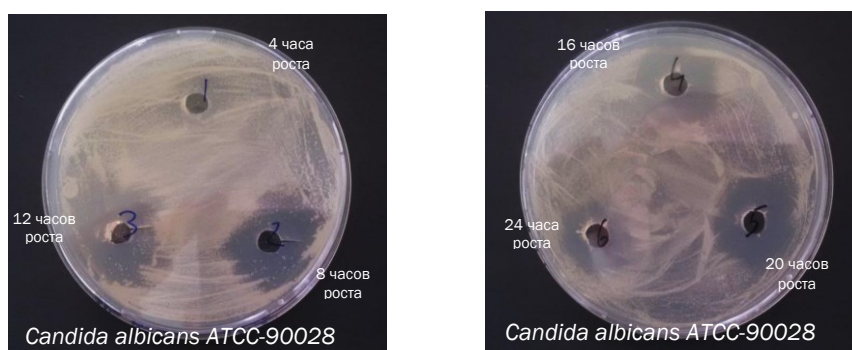


Рисунок 3 – Изменение антагонистической активности КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в отношении *C. albicans* ATCC-90028 в процессе ферментации

По-видимому, синтез антифунгальных метаболитов на ранних стадиях развития культуры обусловлен необходимостью проявления антагонистических свойств в природе – в конкурентной борьбе за субстрат. С соблюдением выше перечисленных условий

культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97 проводилось его выращивание в ферментере Sartorius Biostat B-plus для накопления действующего вещества, дальнейшему изучению его активности и химической природы.

Выделение действующего вещества и определение его химической структуры

Для выделения активных антимикотических компонентов штамма *B. mojavensis* Lhv-97 проводили экстракцию из фильтрата КЖ растворителями различной полярности, в том числе ацетоном, четыреххлористым углеродом, хлороформом, дихлорметаном, этилацетатом, этиловым, изобутиловым, изоамиловым и метиловым спиртами. Выделить антимикотические метаболиты перечисленными выше растворителями не удалось. Активность оставалась в водной фазе КБФ КЖ, из чего был сделан вывод о высокой гидрофильности действующего вещества.

На первом этапе для разделения активных метаболитов КБФ КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 был использован метод обращенно-фазовой хроматографии низкого давления с использованием деионизированной воды и растворов сульфата аммония в качестве элюентов. Было выявлено, что увеличение концентрации сульфата аммония вплоть до 60 % и снижение температуры с 20 до 5 °С оказывает положительное влияние на разрешающую способность колонки, и, как следствие, на чистоту активной фракции. При этом изменение рН с 5 до 13 в рабочем диапазоне сорбента не оказало влияния на разделение компонентов КБФ КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Однако в целом, очистка и разделение метаболитов методом обращенно-фазовой хроматографии низкого давления не дали удовлетворительных результатов по разделению компонентов КБФ КЖ. Поэтому была предпринята попытка использовать обращенно-фазовую ВЭЖХ и эксклюзионную хроматографию низкого давления.

В качестве элюента при ВЭЖХ КБФ КЖ использовали насыщенный раствор гидрокарбоната аммония с последующим разложением этой соли при нагревании, что позволило добиться качественного разделения метаболитов. Однако, при контроле активности действующего вещества методом лунок после термического разрушения соли не наблюдали угнетения роста тест-штаммов, то есть действующее вещество инактивировалось в условиях щелочного гидролиза и повышенных температур. Тем не менее, проведенные процедуры позволили добиться воспроизводимого повышения эффективности колонки С18, которое, в свою очередь, позволило в дальнейшем использовать в качестве элюента деионизованную воду, получая при этом высокий уровень разделения метаболитов: были получены четкие пики, разделенные большим объемом элюента (рис. 4).

Наибольшая зона подавления патогенов соответствовала времени выхода фракции с 12 по 15 минуту и составляла 29 мм (рис. 5). При этом активная фракция была бесцветной и имела низкую концентрацию солей, что соответствовало кондуктивности 0,59 мS/cm.

Несмотря на то, что активная фракция после ВЭЖХ не имела цвета, в ней оставалось значительное количество примесей, которые невозможно было удалить с помощью обращенно-фазовой хроматографии высокого и низкого давления. Поэтому, было принято решение об использовании эксклюзионной хроматографии. При использовании сорбента Sephadex G-10 (SIGMA, Германия), обладающего разделительной способностью от 0,7 кДа до 1,5 кДа, удалось добиться наиболее глубокой очистки как от органических, так и от неорганических примесей (рис. 6). Фракция, проявляющая активность, отбиралась с 25 по 38 минуту и образовывала зону подавления 29 мм. Также активная фракция не обнаруживала поглощения в УФ области и ввиду отсутствия детектора, работающего в ИК диапазоне, для ее выделения ориентировались только на время выхода.

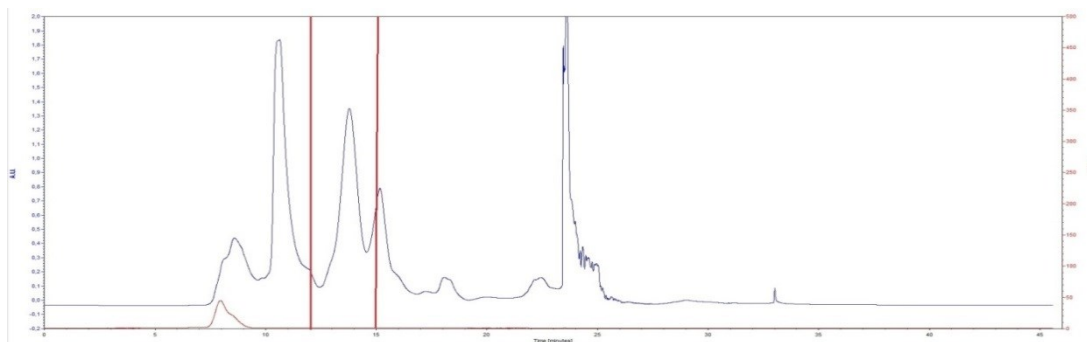


Рисунок 4 – Хроматограмма ВЭЖХ КБФ КЖ на модифицированной гидрокарбонатом аммония колонке C18 с использованием деионизованной воды в качестве элюента: синяя линия – уровень поглощения при 280 нм, красная линия – кондуктивность, вертикальные красные линии показывают выход активной фракции.

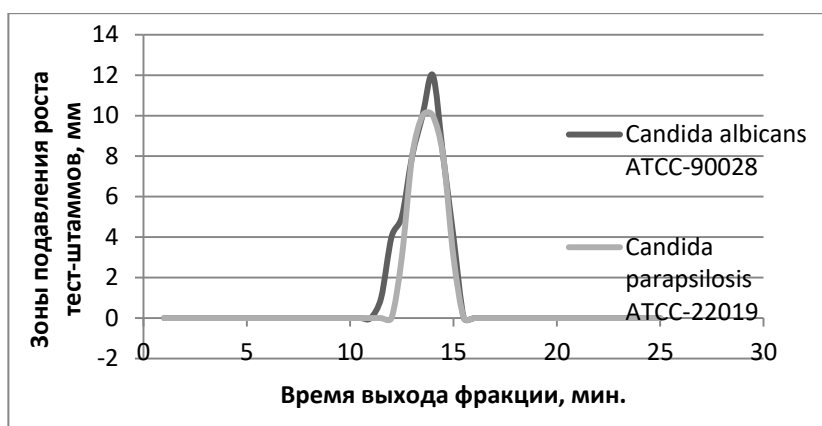


Рисунок 5 - Значение зон подавления роста тест-штаммов фракциями ВЭЖХ КБФ КЖ, полученными в разные периоды времени

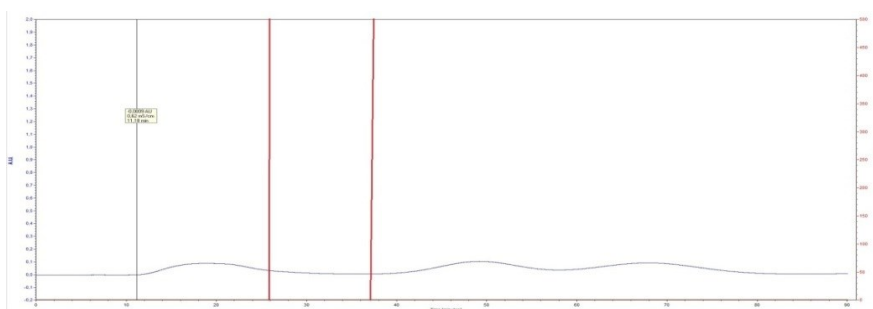


Рисунок 6 - Хроматограмма эксклюзионного процесса КБФ КЖ после ВЭЖХ с использованием сорбента Sephadex G-10 и деионизованной воды в качестве элюента

Для исследования чистоты полученного активного препарата и определения молекулярных масс составляющих его компонентов использовали метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии. С помощью этого метода было показано, что после ВЭЖХ активная фракция содержала значительное количество примесей. Однако после дополнительной эксклюзионной хроматографии активная фракция содержала уже один основной компонент с молекулярной массой 678,51 Да, а количество примесей составляло не более 5 %, что давало возможность использовать полученный образец для исследования его молекулярной структуры (рис. 7). Поскольку определенная молекулярная масса активного антимикотического вещества (АМВ) штамма составляет 678,51 Да, методы газовой

хроматографии и газовой хромато-масс-спектрометрии не могут быть использованы для определения состава такого вещества без его фрагментации.

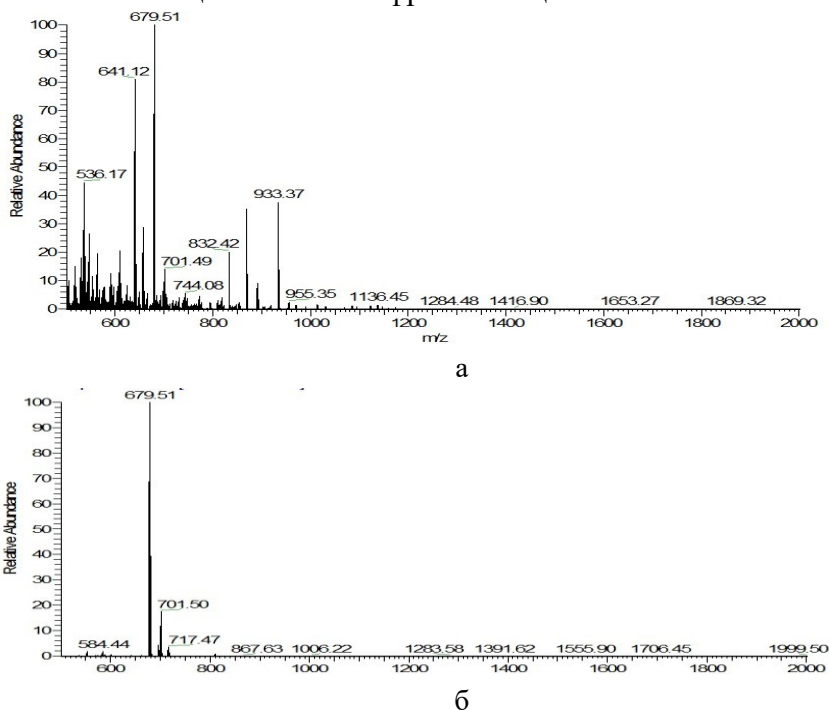


Рисунок 7 - Масс-спектры активной фракции КБФ КЖ штамма Lhv-97: а) после ВЭЖХ; б) после ВЭЖХ с последующей эксклюзионной хроматографией

Проведенные физико-химические исследования свойств АМВ позволили установить, что оно гидрофильно, то есть содержит большое количество полярных групп, не поглощает в УФ области, устойчиво к нагреванию до 100 °С, устойчиво к протеолизу. Все это свидетельствовало о небелковой природе АМВ штамма Lhv-97.

На основании полученных данных в сопоставлении с данными литературы было предположено, что активное вещество может являться аминогликозидом. Гидролиз такого соединения при кипячении в кислой среде должен привести к обнаружению в продуктах реакции сахаров (и их аминокпроизводных) и циклического аминокспирта. Для подтверждения этой гипотезы провели гидролиз АМВ в кислой среде и с помощью газовой хроматографии проанализировали получившиеся в результате вещества, используя различные реагенты для получения их летучих производных. В продуктах гидролиза АМВ была обнаружена глюкоза и, с большой вероятностью, аминокпроизводное 6-членного циклического спирта, а также более легкий полиол, то есть было подтверждено, что АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 является аминогликозидом. Проведенные к настоящему моменту исследования позволяют предположить, что молекула АМВ штамма Lhv-97 содержит два остатка глюкозы, один остаток аминированного циклита С₆, находящегося на конце молекулы, и один остаток легкого полиола, но они не дают возможности предложить точную структуру вещества.

Из известных в литературе аминогликозидов наиболее близкими к исследуемому веществу по молекулярной массе и предполагаемой структуре являются неомицин (молекулярная масса 615 Да) и маннозидострептомицин (743 Да) - антибиотик, продуцируемый *Streptomyces griseus* в качестве примеси при получении стрептомицина (рис. 8). Все остальные промышленно выпускаемые в настоящее время аминогликозиды, кроме неомицина, не содержат дополнительного аминированного остатка глюкозы (как неомицин) и их молекулярные массы составляют менее 600 Да. Таким образом, впервые показано, что

культура *B. mojavensis* синтезирует антимикробные вещества класса аминогликозидов с молекулярной массой свыше 600 Да (678,5 Да).

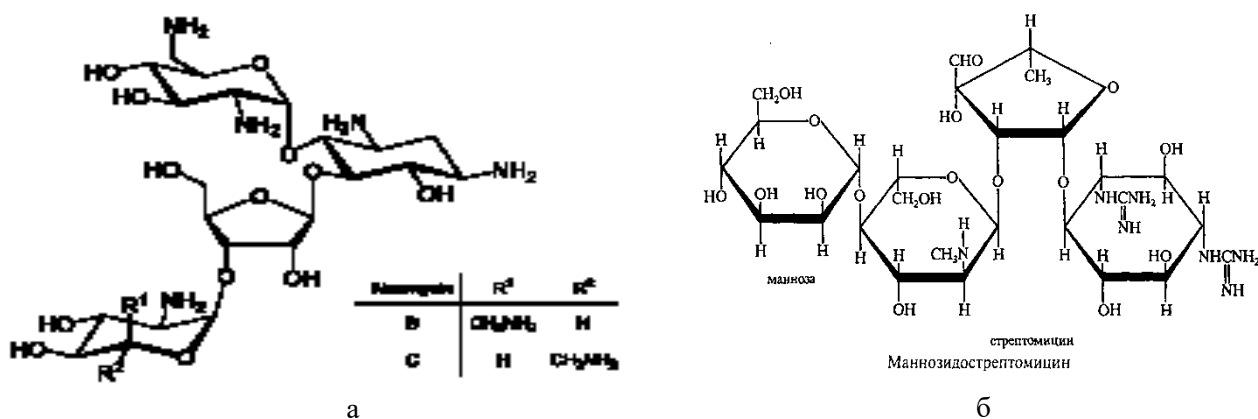


Рисунок 8 – а) Структура неомicina (молекулярная масса 615); б) структура маннозидострептомицина (молекулярная масса 743)

Таким образом, проведенные к настоящему моменту исследования позволили установить, что АМВ штамма Lhv-97 является аминогликозидом, содержащим два остатка глюкозы, один остаток аминированного циклита С₆, находящегося на конце молекулы, и один остаток легкого полиола, но они не дают возможности предложить окончательную структуру АМВ. Для ее выяснения требуются дополнительные исследования.

Исследование активности выделенного АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Для определения минимальной подавляющей концентрации АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 три образца активного вещества: в очищенном виде в концентрации 2 мг/мл, в составе КЖ и КБФ КЖ были разведены в 10, 20, 30, 40 и 50 раз. Действие полученных разведений было проверено на штаммах *C. albicans* ATCC-90028 и *C. parapsilosis* ATCC-22019 (табл.4).

Таблица 4 - Зоны подавления роста тест-штаммов *C. albicans* ATCC-90028 и *C. parapsilosis* ATCC-22019 под действием разных концентраций КЖ, КБФ КЖ и очищенного АМВ

Образец	Зоны подавления роста, мм, при разведении					
	0	10	20	30	40	50
Данные для <i>C. albicans</i> ATCC-90028						
КЖ	23	0	0	0	0	0
КБ ФКЖ	27	21	15	9	0	0
АМВ, 2 мг/мл	27	23	15	9	0	0
Данные для <i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019						
КЖ	23	0	0	0	0	0
КБ ФКЖ	26	23	13	9	0	0
АМВ, 2 мг/мл	27	23	15	9	0	0

Согласно полученным данным, эффективность действующего вещества в составе КБФ КЖ не отличалась от очищенного вещества в концентрации 2 мг/мл, а минимальная подавляющая концентрация АМВ для исследованных тест-штаммов составляет около 70 мкг/мл.

С использованием клинических изолятов *C. albicans* в качестве тест-штаммов провели сравнение очищенного АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 с флуконазолом (OZON Фармацевтика, Россия), который является одним из наиболее эффективных препаратов для лечения кандидозов. Показано, что клинические изоляты *C. albicans* в большинстве случаев

были устойчивы к флуконазолу в концентрации 10 мг/мл, однако были чувствительны к АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл (таблица 5).

Таблица 5 – Сравнение действия флуконазола и активного вещества штамма *B. mojavensis* Lhv-97 на клинические изоляты грибов рода *Candida*

№	Патоген	Размер зон подавления, мм	
		АМВ штамма Lhv-97, 1 мг/мл	Флуконазолом, 10 мг/мл
1	<i>Candida albicans</i> 2	31	0
2	<i>Candida albicans</i> 5	33	0
3	<i>Candida albicans</i> 9	28	0
4	<i>Candida albicans</i> 12	40	0
5	<i>Candida albicans</i> 18	36	7
6	<i>Candida albicans</i> 21	30	0
7	<i>Candida albicans</i> 23	32	0
8	<i>Candida albicans</i> 26	40	0
9	<i>Candida albicans</i> 32	38	0
10	<i>Candida albicans</i> 33	32	0
11	<i>Candida albicans</i> 37	27	0
12	<i>Candida albicans</i> 142	28	0
13	<i>Candida albicans</i> 1721	43	18
14	<i>Candida albicans</i> 2945	41	23
15	<i>Candida albicans</i> K1	40	0
16	<i>Candida krusei</i> Ck№1	28	0

Поскольку АМВ штамма Lhv-97 относится к классу аминогликозидов, на тест-культуре *C. albicans* ATCC-90028 было проведено сравнение его активности с применяемыми в медицине препаратами аминогликозидной природы (рис. 9). Как видно из рисунка 9, если аминогликозидные антибиотики вовсе не действовали на *C. albicans* ATCC-90028 в концентрациях 1-5 мг/мл, то АМВ штамма Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл давало зону подавления шириной до 8 мм.

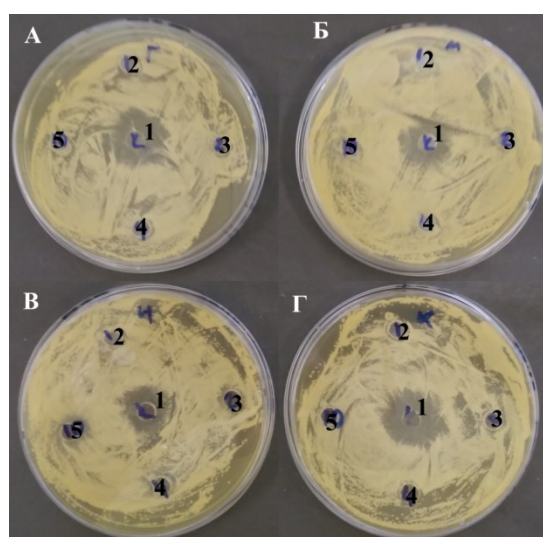


Рисунок 9 - Сравнение активности АМВ штамма Lhv-97 с аминогликозидами: А – гентамицин, Б – амикацин, В – неомицин, Г – канамицин, 1(центральная лунка) – АМВ штамма Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл; остальные лунки с исследуемыми аминогликозидами в концентрациях: 2 – 1 мг/мл, 3 – 2 мг/мл, 4 – 3 мг/мл, 5 – 5 мг/мл.

Получение прототипов препаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97 и его метаболитов

Предложена общая схема приготовления препаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97 (рис 10). После стадии биосинтеза клеточную массу отделяют центрифугированием и высушивают для применения в сельском хозяйстве. Фугат концентрируют в вакуум-выпарной установке и подвергают стерилизующей фильтрации через поры диаметром 0,22 мкм перед очисткой методом ВЭЖХ. Далее грубо очищенная активная фракция может непосредственно использоваться для приготовления жидких или полужидких форм (водные растворы, спреи, гели, мази), либо быть лиофильно высушенной для приготовления сухих форм (порошки, таблетки, капсулы, микрокапсулы) преимущественно сельскохозяйственного и ветеринарного назначения. Дополнительно очищенное методом эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрацией) АМВ может быть использовано в приготовлении жидких и сухих форм для медицины.

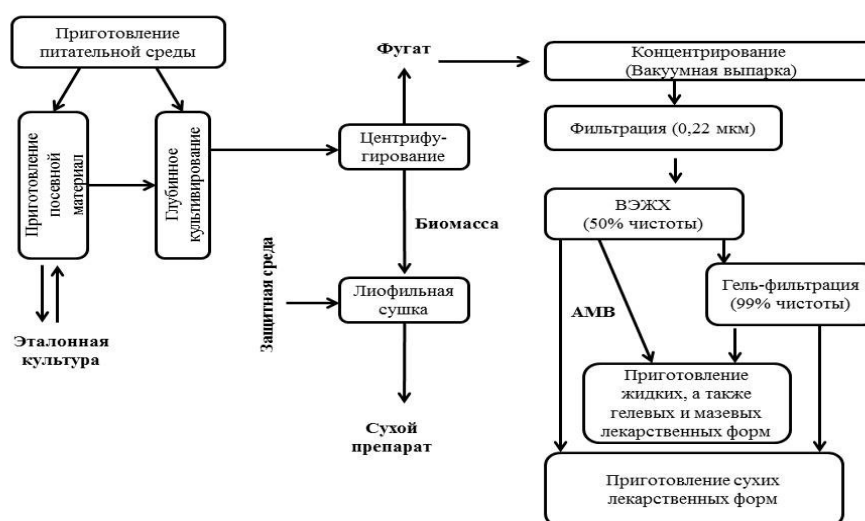


Рисунок 10 - Схема приготовления препаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Предложенную технологию использовали для получения экспериментальных образцов препарата в виде сухого порошка с концентрацией $(4\div 6)\times 10^{10}$ КОЕ/г для испытаний на пшенице. В приложениях к диссертации представлены акты деляночных полевых испытаний приготовленных экспериментальных образцов препарата на основе высушенных клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Испытания были проведены в 2013 г. на базе Рязанского НИИ СХ и в 2015 г. на базе РГАТУ им. П.А. Костычева. Экспериментальные сухие образцы показали высокую эффективность: на яровой мягкой пшенице в отсутствие проявлений инфекций достоверная прибавка урожая относительно контроля при использовании препарата на основе штамма Lhv-97 составила 14,9 % (на уровне действия химического препарата Виал ТТ). На озимой мягкой пшенице при искусственном инфицировании возбудителями снежной плесени при использовании экспериментального препарата на основе штамма Lhv-97 урожайность более чем в 2,5 раза достоверно превысила урожай в инфицированном контроле и более чем в 1,5 раза при использовании химического протравителя Максим экстрим.

Предложенную технологию получения прототипов препаратов на основе метаболитов штамма Lhv-97 использовали также для получения инкапсулированных форм для применения против микозов в медицине и ветеринарии.

Получение полисахаридных гранул

Одним из способов лечения микозов является энтеральный путь введения лекарственных средств, однако биодоступность активных молекул в этом случае часто ограничивается их низкой устойчивостью в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и слабой способностью к прохождению через биологические мембраны и тканевые структуры кишечника. Защитить активные молекулы от деградации в ЖКТ могут инкапсулированные формы антимикотических препаратов, например, приготовленные с применением неусваиваемых (некрахмальных) природных полисахаридов (альгинатов, хитозанов и др.) и липосом.

Для повышения устойчивости АМВ в условиях ЖКТ использовали инкапсулирование с применением альгината натрия и хитозана. Лиофилизация приводила к частичному разрушению альгинатных шариков, что практически не наблюдали после их конвективного высушивания. Гранулы не распадались при нахождении в воде в условиях комнатной температуры в течение месяца. Морфологически наиболее стабильными были гранулы, полученные с использованием тритона X100 и хитозана. На рисунке 11 показано проявление активности альгинатных гранул с АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в отношении *C. albicans* ATCC-90028 в процессе инкапсулирования, после высушивания и увлажнения.

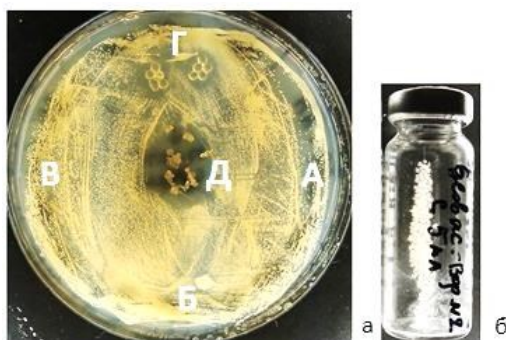


Рисунок 11 - Проявление активности АМВ *B. mojavensis* Lhv-97 в отношении тест-штамма *C. albicans* ATCC-90028 в процессе инкапсулирования, после высушивания и увлажнения: а) вид чашки с нанесенными пробами: А - смесь альгината натрия с АМВ; Б – АМВ; В – альгинат натрия; Г - сырые альгинатные гранулы; Д –высушенные и увлажненные альгинатные гранулы; б) общий вид высушенных гранул, использованных в опыте

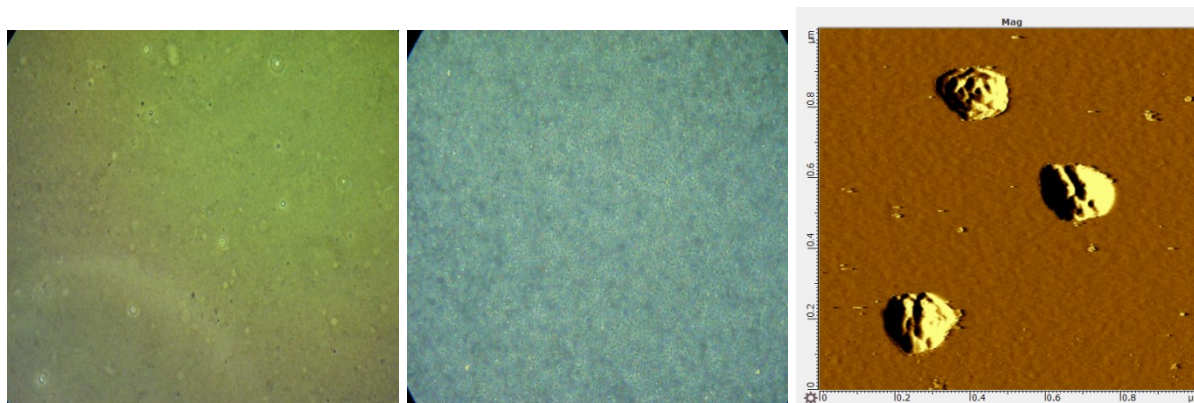
Как следует из рисунка 11, высушенные и увлажненные альгинатные микрогранулы с АМВ Lhv-97 дали наибольшую зону подавления тест-штамма *C. albicans* ATCC-90028. Таким образом, АМВ Lhv-97 не теряет антимикотическую активность после инкапсулирования в альгинатные гранулы.

Разработка липосомальной формы препарата АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Липосомы (фосфолипидные везикулы) как лекарственная форма не только биodeградируемы, но и способны осуществлять более тесное взаимодействие с клетками и тканями живых объектов, тем самым позволяя доставлять действующее вещество к местам локализации патогенов. Липосомы АМВ Lhv-97 получали путем регидратации липидной пленки с последующей экструзией через поликарбонатные микрофильтры с диаметром пор 0,2 мкм. В составе липидной пленки использовали фосфатидилхолин, холестерол, стеароил - ПЭГ 400, пальмитоил-олеилфосфатидилэтаноламин, диметилдиоктадецил аммония бромид (катионоактивный липид). Регидратацию проводили фосфатно-солевым буферным раствором с нейтральным значением рН в смеси с раствором АМВ. Качественно оценку включения АМВ в липосомы проводили с использованием меченого флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ)

АМВ и люминесцентной микроскопии. Разделение получаемого препарата на фракции собственно липосом и невключенного АМВ проводили на колонке с сорбентом Sephacryl S-300HR (SIGMA-ALDRICH, Германия). Определение биологической активности *in vitro* липосом проводили методом лунок.

На рисунке 12 приведены микрофотографии липосом, полученные с помощью оптического (а) и атомно-силового микроскопа (в).



а

б

в

Рисунок 12 – Фото липосом на основе АМВ штамма *V. mojavensis* Lhv-97: а) при увеличении в $\times 2000$; б) полистирольный латекс с размером частиц 0,8 мкм при увеличении в $\times 2000$; в) получено с помощью атомно-силового микроскопа

Для сравнения на рисунке 12б представлены частицы полистирольного латекса размером 0,8 мкм (SIGMA-ALDRICH, Германия) при таком же увеличении. Как следует из фотографий, липосомы в водной среде имеют сферическую форму, которая может изменяться при высыхании на подложке.

Результаты измерения размеров липосом, полученные на лазерном гранулометре, приведены на рис. 13. Из гистограммы дифференциальной кривой объемного распределения частиц по размеру видно, что наибольшее количество частиц имеет размеры около 0,2 мкм (нижняя мода), 3 мкм (средняя мода) и 13 мкм (верхняя мода), что соответствует липосомам, полученным экструзией через поликарбонатные микрофильтры с размером пор 0,2 мкм и их агрегатам. Из интегральной кривой (сплошная синяя линия) можно рассчитать медиану объемного распределения, которая соответствует 5 мкм.

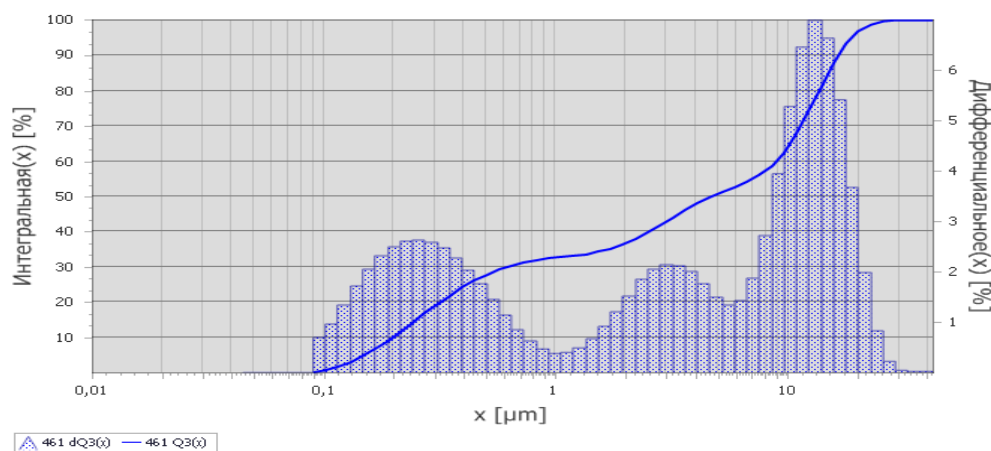


Рисунок 13 - Результаты измерений гранулометрического состава липосомального препарата на основе АМВ штамма Lhv-97

На рис. 14 приведены данные по активности липосомальных препаратов и их фракций, полученных на основе АМВ штамма Lhv-97, меченого ФИТЦ, и немеченого ФИТЦ сразу после приготовления препаратов и после выдержки их при 4-6 °С в течение суток. Меченый и немеченый препараты были приготовлены в одних условиях.

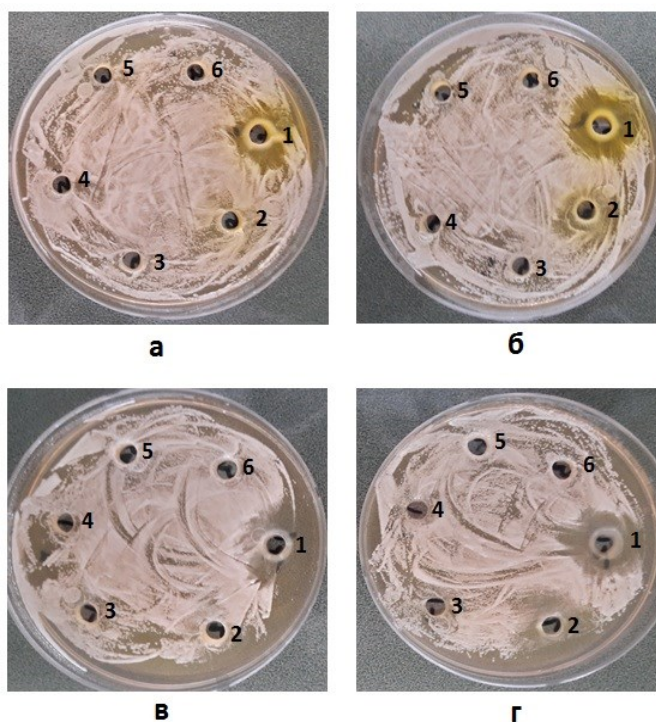


Рисунок 14 – Активность фракций липосомального препарата на основе АМВ штамма Lhv-97, меченого ФИТЦ (а,б), и немеченого ФИТЦ (в,г) в отношении *C. albicans* ATCC-90028 сразу после приготовления препаратов (а,в) и после выдержки их в холодильнике в течение суток: 1) неразделенный липосомальный препарат после экструзии; 2) отделённые на колонке липосомы; 3) фракция мелких липосом и мицелл; 4-6) фракции, содержавшие невключённое АМВ и не связавшуюся с АМВ метку при использовании ФИТЦ

Как и следовало ожидать, наибольшую активность проявляли неразделенные препараты, содержавшие липосомы и невключённое АМВ (№1). Отделённые липосомы (№2) также проявляли активность, которая возрастала после выдержки препаратов при 2-8 °С в течение суток, что демонстрировало выход АМВ из липосомальных везикул. Очевидно, что по этой же причине через сутки возрастала и активность неразделённых препаратов.

Результаты выполненных исследований позволили выбрать методические подходы к созданию эффективных способов инкапсулирования АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 как доступных моделей при разработке систем контролируемой доставки перспективных лекарственных средств.

Испытания препарата на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 против кандидоза ротовой полости у мышей

Эффективность действия препарата в виде водного раствора АМВ штамма Lhv-97, очищенного с помощью ВЭЖХ, оценивали на модели кандидозной инфекции полости рта белых аутбредных мышей. Две группы по пять самок мышей были иммуносупрессированы и заражены суспензией штамма *C. albicans* ATCC-9002. Для снижения иммунитета за 1 сутки до заражения и через 1 сутки после заражения культурой *C. albicans* мышам вводили подкожно по 0,1 мл гидрокортизона (ОАО «Гедеон-Рихтер», Венгрия) в дозе 110 мг/кг. Перед

заражением опытных животных обездвигивали смесью рометара с золетилом (1:5) и укладывали на спину. Культуру *C. albicans* ATCC 90028 наносили на стерильные ватные палочки и помещали в полость рта спящих мышей из опытной и контрольной групп на 60 минут. Каждые 15 минут в течение часа на ватку наносили по 50 мкл культуры. В результате суммарный объем суспензии *C. albicans* ATCC 90028, внесённый в полость рта животных, составил 250 мкл (1×10^7 КОЕ/мышь).

Через сутки после заражения мышам из опытной группы давали препарат АМВ, внесенный в поилку с водой (20 мл) в концентрации 1 мг/мл. Мыши из контрольной группы препарат не получали. Количество выпитой мышами воды в обеих группах в течение 24 часов составило приблизительно 5 мл.

Снижение веса животных обеих групп не происходило. Через 1 сутки контрольная группа показала обсемененность ротоглотки *C. albicans* в концентрации 10^3 КОЕ/г, в то время как рост этого патогена у мышей, получавших препарат на основе АМВ штамма Lhv-97 выявлен не был, что продемонстрировало лечебную эффективность препарата.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного скрининга отобран штамм, проявляющий высокую активность в отношении грибных патогенов человека и животных. Штамм идентифицирован как *Bacillus mojavensis*.

2. Изучены культурально-морфологические и биохимические свойства штамма *B. mojavensis* Lhv-97, показано, что штамм и его метаболиты безопасны для животных.

3. Выявлена различная степень активности штамма *B. mojavensis* Lhv-97 против 36 грибных и 27 бактериальных патогенов человека и животных.

4. Предложен состав питательных сред и условия культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97 с целью синтеза антимикробных метаболитов.

5. Подобраны условия выделения и очистки антимикотического компонента *B. mojavensis* Lhv-97 с помощью жидкостной хроматографии.

6. Активность штамма *B. mojavensis* Lhv-97 обусловлена веществом из класса аминогликозидов.

7. Разработаны подходы к созданию эффективных способов инкапсулирования антимикотического соединения *B. mojavensis* Lhv-97.

8. Экспериментальный образец биопрепарата на основе клеток *B. mojavensis* Lhv-97 показал эффективность в полевых испытаниях на яровой и озимой пшенице, в том числе при искусственном инфицировании возбудителями снежной плесени.

9. Экспериментальный образец препарата на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 показал эффективность его применения для лечения кандидоза ротовой полости у беспородных белых мышей.

10. На основании результатов проведенных испытаний *B. mojavensis* Lhv-97 может быть рекомендован для создания на его основе биопрепаратов для лечения микозов человека и животных. Также препарат на основе живой культуры Lhv-97 может использоваться в сельском хозяйстве для борьбы с грибными фитопатогенами.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Похиленко, В.Д. Имобилизация антимикробных веществ бактериального происхождения в полимерные матрицы и оценка их свойств. / В.Д. Похиленко, И.А.

Дунайцев, В.В. Перелыгин, **И.О. Лев**, Т.А. Калмантаев // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №6.-10с. DOI 10.17513/spno.25472.

2. Дунайцев, И.А. Эффективность использования штамма *Bacillus mojavenensis* для повышения урожайности пшеницы. / И.А. Дунайцев, **И.О. Лев**, М.В. Клыкова, С.К. Жиглецова, О.А. Антошина, Л.В. Коломбет // Агрохимия. – 2017. - №4. – С. 76–82.

б) патенты:

3. Патент РФ №2603281. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis* Vsk-26a3, обладающий фунгицидной и бактерицидной активностью. / М.В.Клыкова, И.А. Дунайцев, С.К. Жиглецова, Т.Н. Кондрашенко, **И.О. Лев**, И.М. Сосна, И.В. Торгонина, Т.А. Варламова // 2016. - Бюл. №33.

4. Заявка на патент РФ №2017128916. Штамм бактерий *Bacillus mojavenensis* Lhv-97, обладающий фунгицидной и бактерицидной активностью. / И.А. Дунайцев, **И.О. Лев**, М.В. Клыкова, С.К. Жиглецова, И.М. Сосна, И.В. Торгонина, Т.А. Варламова.

в) статьи в других рецензируемых изданиях

5. Клыкова, М.В. Влияние различных факторов на биосинтез штаммом *Pseudomonas sp.* метаболитов, активных в отношении грибных патогенов. / М.В. Клыкова, И.А. Дунайцев, **И.О. Лев**, С.К. Жиглецова, Т.Н. Кондрашенко // Успехи медицинской микологии.- 2014.- Т. 12.- С. 410-412.

6. **Лев, И.О.** Возможности использования низкомолекулярных пептидов, биосурфактантов, и бактериальных метаболитов в качестве природных антимикробных средств. / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // Наука и хозяйство .- 2015.- №10.- С. 20-24.

7. Похиленко, В.Д. Найти свой путь в биотехнологии. / В.Д. Похиленко, М.Н. Мартовецкий, **И.О. Лев** // Научград. Наука, производство, общество. – 2016. - №3.- С. 15-21.

8. **Лев, И.О.** Антимикробные свойства низкомолекулярных пептидов, биосурфактантов и метаболитов из некоторых видов энтерококков и бацилл. / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // В сб.: Актуальные вопросы развития современного общества, сборник научных статей по материалам I Международной научно-практической конференции 15 мая 2016 г., г. Пермь.- С. 57-62.

г) тезисы докладов на научных конференциях:

9. **Лев, И.О.** Поиск бацилл, активных в отношении грибных патогенов. / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, М.В. Клыкова, Н.С. Ларина, С.К. Жиглецова // Проблемы медицинской микологии.- 2013.-Т.15.- №2.- С.97.

10. Клыкова, М.В. Скрининг микроорганизмов-антагонистов, активных в отношении бактериальных и грибных патогенов. / М.В. Клыкова. И.А. Дунайцев, **И.О. Лев**, Н.С. Ларина, С.К. Жиглецова // Проблемы медицинской микологии. 2013.- Т. 15.- № 2.- С. 87.

11. **Лев, И.О.** Оптимизация синтеза антифунгальных метаболитов *Geobacillus thermoglucosidasius*. / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, М.В. Клыкова, С.К. Жиглецова, Т.Н. Кондрашенко // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины».- Ставрополь.- 2014 г.- С. 128-129.

12. **Лев, И.О.** Получение, очистка и первичная характеристика антифунгального вещества, продуцируемого штаммом *Bacillus mojavenensis* Lhv-97. / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // Материалы IX международного конгресса: Биотехнология: состояние и

перспективы развития 20-22 февраля 2017. - Москва, Гостиный Двор. - 2017. - Т. 1. - С. 186-187.

13. **Лев, И.О.** Подбор условий выделения и очистки нового антимикотического метаболита штамма *Bacillus mojavensis* и определение его структуры. / **И.О. Лев**, С.К. Жиглецова, А.В. Ариповский, И.А. Дунайцев, А.К. Сурин, М.В. Клыкова // Современная микология в России (тезисы докладов 4 съезда микологов России). - 2017. - Т.7. - с. 240-242.

14. Дунайцев, И.А. Разработка инкапсулированных форм на основе антигрибных веществ бактериального происхождения. / И.А. Дунайцев, **И.О. Лев**, А.Н. Сомов, М.В. Клыкова, В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин, Е.М. Хаков // Современная микология в России (тезисы докладов 4 съезда микологов России). – 2017. - Т.7. - С. 223-225.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АМВ	антимикотическое вещество
БФ КЖ	бесклеточный фильтрат культуральной жидкости
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГНЦ ПМБ	Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ГРМ	гидролизат рыбной муки
ГХ	газовая хроматография
ДЭ	дрожжевой экстракт
КГА	картофельно-глюкозный агар
КЖ	культуральная жидкость
КОЕ	колониеобразующие единицы млрд/мл, млрд/г
КБФ КЖ	бесклеточный концентрат фильтрата культуральной жидкости
НИИ СХ	научно-исследовательский институт сельского хозяйства
ОП	оптическая плотность
ФИТЦ	флуоресцеина изотиоцианат
ФРМ	фосфатрастворяющие микроорганизмы
pH	водородный показатель активности ионов водорода,
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт

Выражаю искреннюю благодарность:

моим руководителям д.т.н. Похиленко В.Д. и к.б.н. Дунайцеву И.А. за оказанную помощь при выполнении диссертационной работы;

сотрудникам ФБУН ГНЦ ПМБ к.х.н. Жиглецовой С.К., к.б.н. Копылову П.Х., к.б.н. Клыковой М.В., к.х.н. Ариповскому А.В., к.б.н. Фурсовой Н.К., к.ф.-м.н. Сурина А.К., к.ф.-м.н. Сомову А.Н., к.ф.-м.н. Вирясову С.Н., к.м.н. Борзилову А.И., Лев А.И., сотруднице ГНУ Рязанского НИИСХ к.с.-х.н. Антошиной О.А. за содействие в проведении экспериментальных исследований;

Государственному научному центру прикладной микробиологии и биотехнологии, в лице академика РАН, д.м.н., профессора Дятлова И.А. за предоставленную возможность провести необходимые эксперименты и выполнить представленную работу.