

## Микробиология

### Фоновый мониторинг микрофлоры кур.

Для мониторинга микрофлоры отбирали помет кур, а также делали мазки из клоаки. Даты отбора проб: 11 сентября 2016; 11 октября 2016; 11 ноября 2016; 26 ноября 2016.

Образцы отбирали в клетках, в которых содержатся опытные и контрольные группы кур и петухов, случайным образом в разных частях клетки, помещали в стерильные контейнеры и при температуре +4°C доставляли в лабораторию. Для мазков использовали систему Transystem – Amies medium (Copan diagnostics США). Данные мазков и посевов помета качественно не отличались.

В лаборатории каждый образец помета тщательно перемешивали, разводили стерильным физраствором 1:9 по массе, и далее готовили ряд последовательных десятикратных разведений, из которых производили поверхностный посев на питательные среды. Анализ микрофлоры проводили по стандартным методикам (Методические рекомендации..., 2004).

В процессе мониторинга не было выявлено достоверных изменений между микрофлорой кур и петухов в различных группах. Во всех группах не было отмечено снижения в количественном и процентном соотношении лакто- и бифидобактерий. Количество бифидобактерий во всех пробах на всех этапах отбора превышало  $10^6$  КОЕ/г.

Бактерий р. *Salmonella* и *Shigella* ни в одной пробе за все время исследования обнаружено не было.

Количество бактерий р. *Lactobacillus* в контроле не изменялось во времени и составило от  $(1,0 \pm 0,2)10^7$  до  $(1,2 \pm 0,1)10^7$  КОЕ/г. В опытных группах количество лактобацилл увеличивалось со временем и достигло от  $(2,3 \pm 0,4)10^7$  до  $(2,5 \pm 0,3)10^7$  КОЕ/г.

Количество колиформных бактерий колебалось в широких пределах от  $(1,0 \pm 0,1)10^7$  до  $(9,2 \pm 0,8)10^7$  КОЕ/г. В пробе от 11 октября и последующих наблюдается снижение количества колиформных бактерий у групп, получавших все типы пробиотических препаратов, по сравнению с контрольной группой.

Количество бактерий р. *Staphylococcus* составило от  $(1,1 \pm 0,2)10^6$  до  $(5,8 \pm 0,8)10^6$  КОЕ/г. Можно отметить тенденцию к снижению со временем количества стафилококков в помёте всех исследованных групп. Количество стафилококков в контрольной группе было выше, чем в опытных, во всех случаях, кроме пробы от 11 октября.

Количество энтерококков колебалось в пределах от  $(0,7 \pm 0,3) 10^6$  до  $(8,6 \pm 0,9)10^6$  КОЕ/г, в целом отмечается тенденция к снижению количества энтерококков в помёте всех групп.

Помимо прочего, было отмечено присутствие в помете незначительного количества дрожжей р. *Candida*, которое сильно варьировало в пределах от  $(0,3 \pm 0,1)10^4$  до  $(11,2 \pm 1,4)10^4$  КОЕ/г.

Первоначально в помёте кур бацилл обнаружено не было. После 10 недель введения препаратов было отмечено появление бактерий *B. amyloliquefaciens* B1895 в количестве  $(1,5 \pm 0,5) 10^3$  и  $(2 \pm 0,5) \cdot 10^3$  КОЕ/г в помёте у кур, получавших препарат на основе *B. amyloliquefaciens* B1895 (группа II) или смешанный препарат (группа III).

Таблица \_. Количество бактерий, выделенных из помёта кур.

Дата отбора	Номер группы	Lacto-bacillus, $10^7$ КОЕ/г	<i>E.coli</i> и колиформы $10^7$ КОЕ/г	Enterococcus $10^6$ КОЕ/г	Stapylococcus $10^6$ КОЕ/г	<i>Candida</i> $10^4$ КОЕ/г	<i>B. amyloliquefaciens</i> B1895 $10^3$ КОЕ/г
11.09.16	Контроль	1,0±0,2	6,1±0,8	6,3±0,9	5,8±0,8	1,0±0,3	-
	I	1,3±0,2	9,2±0,8	8,6±0,9	3,8±1,0	5,1±1,2	-
	II	0,6±0,3	8,1±1,1	2,1±0,3	1,3±0,6	3,6±0,6	-
	III	0,7±0,4	5,8±0,8	1,9±0,3	1,8±0,3	2,8±0,5	-
11.10.16	Контроль	1,0±0,3	2,7±0,3	3,2±0,7	3,9±0,6	10,1±1,2	-
	I	0,6±0,2	2,1±0,5	5,7±0,8	3,9±0,8	5,7±0,9	-
	II	0,5±0,3	2,3±0,5	5,5±1,2	5,2±1,2	5,0±1,2	-
	III	0,7±0,2	1,8±0,3	0,8±0,3	4,8±0,7	6,8±0,9	-
11.11.16	Контроль	1,2±0,4	4,5±0,6	5,3±1,2	2,9	11,2±1,4	-
	I	1,4±0,3	2,0±0,6	0,7±0,3	2,2±0,3	6,0±1,0	-
	II	1,3±0,4	1,5±0,4	1,2±0,4	2,0±0,6	8,0±1,2	2,0±0,5
	III	1,4±0,3	1,0±0,1	1,4±0,3	2,3±0,6	8,1±1,0	1,5±0,5
26.11.16	Контроль	1,2±0,1	8,3±1,1	1,7±0,3	3,6±1,0	0,3±0,1	-
	I	2,3±0,4	5,6±0,6	2,0±0,5	1,3±0,4	2,3±0,5	-
	II	2,5±0,3	5,6±0,8	1,4±0,4	1,1±0,2	3,0±0,7	-
	III	2,5±0,4	7,8±1,2	1,9±0,5	1,8±0,5	6,1±0,9	2,0±0,5

#### Формирование набора пробиотических штаммов бактерий

При разработке плана исследований, исходя из опубликованных ранее данных, для решения главной задачи проекта по применению пробиотиков в сельском хозяйстве и медицине, были отобраны два пробиотических штамма: *Bacillus subtilis* KATMIRA1933, выделенный из кисломолочного продукта (Sutyak et al., 2008) и *Bacillus amyloliquefaciens*

В-1895, выделенный из почвы. Штаммы были отобраны в связи с взаимодополнительным характером их пробиотических параметров. Был отмечен прирост массы тела бройлеров при использовании препаратов на основе В-1895 в качестве добавки к корму (Chistyakov et al., 2015). При использовании В-1895 в рыбном хозяйстве отмечалось увеличение выживаемости мальков шемаи за счёт снижения количества патогенных микроорганизмов (Golovko et al., 2008). В наших ранних исследованиях было также показано, что *B. subtilis* КАТМІРА1933 обладает противомикробным действием против всех исследованных штаммов *Porphyromonas gingivalis*, в то время как *B. amyloliquefaciens* В-1895 проявлял антимикробную активность по отношению к *Streptococcus intermedius* F0413 (Algburi et al., 2015). *B. amyloliquefaciens* В-1895 не проявляла гемолитической активности, у *B. subtilis* КАТМІРА1933 была выявлена слабая гемолитическая активность. Так же было показано, что оба штамма обладают фибринолитической активностью, причём у *B. subtilis* КАТМІРА1933 она выше. Показано, что оба штамма бацилл обладают высокой способностью к самоагрегации, причём у штамма *B. amyloliquefaciens* В-1895 она выше. Так же обнаружен высокий уровень коагрегации обоих штаммов с патогенными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, при этом *B. subtilis* КАТМІРА1933 также коагрегировал с такими патогенами как *Salmonella enterica* и *Listeria monocytogenes*.

Споры обоих штаммов показали высокую устойчивость к рН 3.0, 2.5, 2.0, и концентрациям жирных кислот, соответствующим условиям в ЖКТ.

Однако самой главной из описанных в литературе особенностей вышеназванных штаммов, определившей использование их в нашем исследовании было то, что их метаболиты проявляют антиоксидантные и ДНК-протекторные свойства (Prazdnova et al., 2015). Для практического применения препаратов на основе данных штаммов было необходимо установить, сохраняются ли подобные свойства в полной мере при изготовлении пробиотического препарата методом твердофазного культивирования, использованным в данном проекте ввиду технологических преимуществ. В связи с этим была проведена серия опытов с использованием системы бактериальных Lux-биосенсоров в качестве детекторов целевой активности. Активность метаболитов из культуры штаммов *B. subtilis* КАТМІРА1933 и *B. amyloliquefaciens* В-1895, выращенной в жидкой среде (суточная культура, выращенная на среде LB, доведенная до плотности 1 по Мак-Фарланду), сравнивалась с аналогичной активностью водного экстракта сухого препарата (0,1 г/мл), прошедшего все стадии технологической обработки. Конечный титр препарата был определен путем посева на питательные среды. Помимо неразбавленного супернатанта, использовали также разведения его в воде в 10 и 100 раз. При интерпретации данных делался расчет соответствующих разведениям значений КОЕ/мл.

Методика постановки теста и расчета протекторной активности подробно описана в работе (Prazdnova et al., 2015).

Было установлено, что метаболиты *B. subtilis* КАТМІРА1933 проявляют значительную ДНК-протекторную активность, в большинстве случаев снижающуюся при разведении препарата (экстракта) водой.

Антигенотоксическая (ДНК-протекторная) активность *B. subtilis* КАТМІРА1933, определенная с помощью биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 pRecA-lux, составила:  $6,70 \pm 1,45$  % для экстракта из жидкой культуры, концентрация которого соответствовала  $10^6$  КОЕ/мл, и  $25,31 \pm 3,13$  % для экстракта сухого препарата с соответствующим титром;  $38,60 \pm 3,44$ % и  $75,90 \pm 5,94$  % для экстрактов жидкой культуры и сухого препарата, соответственно, для  $10^7$  КОЕ/мл;  $5,63 \pm 1,98$  % для экстракта жидкой культуры для  $10^8$  КОЕ/мл (для сухого препарата соответствующую концентрацию не определяли, т.к. максимальный титр в препарате был ниже).

Аналогичная активность, определенная при помощи штамма *E. coli* MG1655 pColD-lux, составила:  $22,13 \pm 4,56$  % для экстракта из жидкой культуры, концентрация которого соответствовала  $10^6$  КОЕ/мл, и  $67,02 \pm 8,51$ % для экстракта сухого препарата с соответствующим титром;  $42,66 \pm 6,64$  % и  $86,60 \pm 5,07$ % для экстрактов жидкой культуры и сухого препарата, соответственно, для  $10^7$  КОЕ/мл;  $58,41 \pm 9,94$ % для экстракта жидкой культуры для  $10^8$  КОЕ/мл.

Кроме того, можно видеть, что во всех пробах ДНК-протекторная активность метаболитов, выделенных из сухого препарата, выше, чем аналогичная активность культуры, выращенной в жидкой среде.

Метаболиты *B. amyloliquefaciens* В-1895 также проявили ДНК-протекторную активность, незначительно более низкую, чем *B. subtilis* КАТМІРА1933 (максимальные значения  $71,24$ % против  $86,6$ %, соответственно). В большинстве проб активность метаболитов, присутствующих в сухом препарате, не имела статистически достоверных отличий от таковой для культуры, выращенной в жидкой среде. Так, при определении ее с помощью биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 pRecA-lux, были получены следующие значения:  $3,12 \pm 1,3$ % и  $2,56 \pm 0,74$ % для экстрактов жидкой культуры и сухого препарата, соответственно, при титре  $10^6$  КОЕ/мл;  $20,98 \pm 8,03$ % и  $19,50 \pm 2,43$ % при  $10^7$  КОЕ/мл;  $36,99 \pm 1,34$ % и  $22,16 \pm 5,67$ % для экстракта, концентрация которого соответствовала  $10^8$  КОЕ/мл. В тесте со штаммом *E. coli* MG1655 pColD-lux были получены следующие значения:  $43,79 \pm 6,22$ % и  $53,73 \pm 6,35$ %;  $71,24 \pm 8,24$ % и  $68,74 \pm 5,18$ %;  $73,57 \pm 10,12$ % и  $66,12 \pm 9,47$ % для аналогичных параметров.

Было также обнаружено, что метаболиты обоих штаммов проявляют антиоксидантную активность, причем, как и в случае с ДНК-протекторной активностью, для штамма *B. subtilis* КАТМІА1933 эффект выше, чем для *B. amyloliquifaciens* В-1895 (60,19 % против 42,80 %, соответственно). Активность метаболитов, выделенных из сухого препарата, для обоих штаммов в большинстве проб статистически значимо отличалась от таковой для экстракта из жидкой культуры, и была значительно ниже (в 2,3-7,6 раз для *B. subtilis* КАТМІА1933 и 2,0-3,3 раз для *B. amyloliquifaciens* В-1895).

Были получены следующие значения антиоксидантной активности метаболитов *B. subtilis* КАТМІА1933: 60,19±3,69% для экстракта из жидкой культуры, концентрация которого соответствовала 10<sup>6</sup> КОЕ/мл, и 7,97±1,33% для экстракта сухого препарата с соответствующим титром; 30,66±1,69% и 13,12±3,71% при 10<sup>7</sup> КОЕ/мл; 39,77±1,61% для экстракта жидкой культуры для 10<sup>8</sup> КОЕ/мл.

Антиоксидантная активность метаболитов *B. amyloliquifaciens* В-1895 была 42,80±13,45% для экстракта из жидкой культуры, концентрация которого соответствовала 10<sup>6</sup> КОЕ/мл, и 16,32±2,80% для экстракта сухого препарата с соответствующим титром; 26,29±2,82% и 13,14±2,88% при 10<sup>7</sup> КОЕ/мл; 49,40±5,11% и 15,00±1,19% при 10<sup>8</sup> КОЕ/мл.

Таким образом, можно заключить, что ДНК-протекторные и антиоксидантные свойства характерны и для сухого препарата, полученного методом твердофазной ферментации. Два типа активности обеспечиваются разными веществами или группами веществ. Наблюдаемое в наших опытах отсутствие зависимости доза-эффект в изученном диапазоне доз для антиоксидантного эффекта, в отличие от ДНК-протекторного, может служить подтверждением данного тезиса. Кроме того, как установлено в наших предшествующих опытах, антиоксидантный эффект снижается при прогревании экстракта до 85°C, тогда как на ДНК-протекторный прогревание экстракта не влияет (Prazdnova et al., 2015). Более низкая антиоксидантная активность экстракта сухого препарата по сравнению с полученным из жидкой культуры может объясняться воздействием высоких температур при сушке препарата.

Безусловную актуальность имеет вопрос о химической природе веществ, обеспечивающих наблюдаемые ДНК-протекторные и антиоксидантные свойства. Готовя публикацию (Prazdnova et al., 2015) мы, как и большинство исследователей, полагали, что вещества с протекторной активностью, в основном биогенные амины, синтезируются внутри бактериальной клетки. Однако появляется все больше сообщений о том, что пептиды с высокой антиоксидантной активностью могут образовываться при расщеплении бактериальными протеазами казеина и других белков (Pessione, Cirrincione, 2016). Как показали наши исследования, выполненные в рамках данного проекта,

ключевой аминокислотой, обуславливающей антиоксидантные и ДНК-протекторные свойства пептидов может быть лизин. Эксперименты с синтетическими олигопептидами показали, что способность олигопептидов защищать клетки от действия физических прооксидантных факторов (УФ-облучение) связана с наличием в молекуле остатка лизина. Для химических прооксидантов (диоксидин) наблюдается схожая, хоть и менее строгая закономерность. Описанный эффект также коррелирует с ДНК-протекторной активностью исследуемых олигопептидов. Таким образом, богатые лизином белки сои (субстрата для ферментации использованных нами бацилл) в принципе могут быть источником криптопептидов с адресной активностью. Проверка этого предположения станет задачей наших дальнейших исследований.

В ходе физиологических исследований было выявлено еще два факта, важных для формирования набора исследуемых штаммов. Во-первых, через 70 дней после начала введения препаратов, содержащих *Bacillus subtilis* КАТМІРА1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895, в экскрементах птиц были обнаружены лишь клетки *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895. Полное усвоение курами спор КАТМІРА1933 является принципиальным отличием действия этого штамма от В-1895. Во-вторых, при использовании двух штаммов одновременно физиологический эффект, проявляющийся в ускорении набора массы, проявлялся заметно слабее, чем при использовании штаммов по отдельности. Эти наблюдения позволяют поставить вопрос о том, какие физиолого-биохимические отличия двух штаммов могут быть причиной наблюдаемого взаимодействия? Важно при этом, что антагонизм между двумя штаммами *in vivo* отсутствует (см. рис.) Одним из главных отличий *B. subtilis* КАТМІРА1933 от *B. amyloliquefaciens* В-1895 является способность штамма КАТМІРА1933 к выработке субтилозина А. Данное вещество представляет собой циклический анионный лантибиотик, относящийся к бактерицинам (генетически кодируемые антимикробные белки бактериального происхождения), который взаимодействует с поверхностным рецептором и электростатически связывается с мембраной чувствительной к его действию бактериальной клетки. Как известно, естественной формой существования популяций микробиоты желудочно-кишечного тракта является биопленка. Образование биопленок регулируется сигнальными молекулами, относящимися к механизму так называемого Quorum Sensing (QS). Поэтому для проверки нашего предположения мы оценили способность субтилозина А подавлять QS в Грам-положительных (*Listeria monocytogenes*, штамм ScottA), Грам-отрицательных (*Escherichia coli*, штамм/серотип O157:H7) и Грам-вариабельных бактериях (*Gardnerella vaginalis*, штамм ATCC 14018). Данные

микроорганизмы выбраны в связи с хорошей изученностью механизмов как QS, так и образования биопленок (Colagiorgi et al., 2016; Sharma et al., 2010; Machado et al., 2016). Субтилосин А выделяли и очищали по методу Sutyak Noll et al. (2008), протокол подробно описан в работе [Algburi et al., 2016]. Коротко: субтилосин А был сконцентрирован сульфатом аммония из свободной от клеток культуральной жидкости, полученной в результате ферментации штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA1933, и очищен хроматографией на колонке.



Рис. Совместный посев KATMIRA 1933 и В – 1895 на LB агар

Были определены минимальные и суб-минимальные ингибирующие концентрации (MIC), а также изучена возможность предотвращения образования биопленок

Способность субтилозина А подавлять QS в Грам-положительных бактериях была изучена с помощью ранее описанного метода, т.н. “Fe (III) reduction assay” (Wattanavanitchakorn et al. 2014).

Способность субтилозина А подавлять рост и образование биопленок отмечены в экспериментах со всеми исследованными штаммами бактерий.

Наши данные показали, что *Gardnerella vaginalis* (вагинальный патоген, влияющий на развитие бактериального вагиноза) был более чувствителен к субтилозину А (MIC of 6.25 мкг/мл), чем *Listeria monocytogenes* (125 мкг/мл), пищевой патоген с одной из самых высоких (до 35%) смертностью среди заражённых. MIC для остальных штаммов были в пределах от 6.25 до 125 мкг/мл.

Минимальные концентрации субтилозина, подавляющие развитие биопленок *G. vaginalis*, *L. monocytogenes* и *E. coli* составили 0,19; 0,9 и 0,98 мкг/мл соответственно.

Самая низкая концентрация субтилозина А, при которой образование биофильма *G. vaginalis* было подавлено на 90%, без какого-либо влияния на рост планктонных клеток этого патогена, составила 0.78 мкг/мл. Порядка 80% подавления биофильмообразования клетками *L. monocytogenes* и около 60% подавления биофильмообразовани пищевым патогеном *Escherichia coli* O157:H7 наблюдалось при использовании 15.1 мкг/мл субтилозина А.

При использовании 7.8-125 мкг/мл субтилозина А наблюдалось существенное уменьшение образования индуктора QS и, соответственно, биопленкообразования виолацеина, без какого-либо подавления роста *C. violaceum*. Продукция аутоиндуктора-2 (AI-2) клетками *G. vaginalis* была существенно подавлена субтилозином А в концентрации 3 и 4 мкг/мл. Однако, sub-MIC субтилозина А (0.95-15.1 µg/mL) не влияли на продукцию AI-2 клетками *L. monocytogenes*. Таким образом, способность субтилозина подавлять развитие биопленок достаточно высока.

Подобные эффекты вполне могут способствовать существенному переходу микробиоты ЖКТ в планктонную форму с активацией неспецифического иммунитета. Можно также предположить, что отсутствие клеток штамма KATMIRA1933 в



эксскрементах связано с активацией бактерицидных систем ЖКТ птиц за счет массового разрушения биопленок симбиотических бактерий выделяемым ими субтилозином. Проверка того, работает ли реально данный механизм в условиях нашего эксперимента *in vivo*, будет осуществлена на следующих этапах проекта. Проведенные исследования дали еще один важный результат, хотя и не относящийся непосредственно к основной задаче исследования. По нашим сведениям, опубликованная в рамках данного проекта статья - это первое сообщение о возможности предотвращения образования биопленок опасного патогена *G. vaginalis* в результате подавляющего QS действия субтилозина А, антимикробного белка (бактериоцина), продуцируемого спорообразующим пробиотиком *B. subtilis* KATMIRA1933.

В заключение необходимо отметить, что оба штамма, отобранные нами для физиологического эксперимента проявили сходную физиологическую активность, выражающуюся в стимуляции роста, как курочек, так и петушков. Поэтому их выбор представляется вполне оправданным. При этом механизмы наблюдаемой активности могут быть разными, что требует дальнейшего изучения. Неожиданным было снижение эффекта при объединении двух штаммов в одной рецептуре. Необходимо исследовать механизм этого явления.

Запуск участка производства пробиотических препаратов для исследования

На базе Поволжского научно-исследовательского института производства и переработки мясомолочной продукции в 2016 г был запущен участок производства необходимых для исследования пробиотических препаратов. Для организации лабораторного производства пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* была применена твердофазная ферментация. Этот подход дает возможность добиваться высоких титров целевых штаммов без применения сложного специализированного оборудования.

Оптимальным субстратом для пробиотических бактерий являются гидратированные соевые бобы, прошедшие термообработку. Используемая технология и получаемый по ней препарат были апробированы нами ранее (Chistyakov et al., 2015)

### **Пробиотические штаммы, стартеры.**

Для использования в качестве инокулята используются культуры штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* 1895 и *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933. В качестве стартера для

выработки 800 – 1000 г сухого препарата использовали чашки Петри со средой LB, покрытые газоном бактерий.

### **Оборудование**

Электроплитка Веста двухконфорочная (Россия), Скороварка Mayer&Voch MB-3031 (КНР), Термостат электрический суховоздушный ТС – 80 (Украина), мясорубка Braun Pover Plus 1300, Чешская Республика, Мельница проб МРП-2 (Россия)

### **Изложение технологического процесса**

Взвешивается необходимое количество соевых бобов. Оптимально для лабораторной технологии 1 кг. Бобы промываются проточной водопроводной водой. Бобы сои замачиваются на 12 часов в воде в эмалированной емкости при температуре 20-22°C. Бобы сои стерилизуются в скороварке с использованием специального вкладыша для обработки «на пару» при 115°C в течение 40 минут. Проавтоклавированные бобы переносятся в емкость для инокулирования и охлаждаются до 60°C. В бобы вносится агар с газоном пробиотического штамма с одной чашки Петри. Культура бактерий тщательно перемешивается с бобами. Инокулированные соевые бобы помещаются в кастрюлю с плоским дном и неплотно закрываются крышкой. Сосуды с инокулированными бобами сои помещаются в инкубатор. Процесс инкубации длится в течение 24- часов при температуре 45°C. Ферментированный субстрат измельчается при помощи электрической либо ручной мясорубки.

После каждой инкубации термостат-инкубатор и детали мясорубки, контактирующие с бактериями, подвергают влажной уборке с применением моющих средств и, затем, обрабатывают 3% перекисью водорода и высушивают. Пластиковые поддоны после инкубации обрабатывают таким же образом. Измельченный препарат распределяется тонким слоем на металлических подносах и высушивается при температуре 50 °C до влажности 8 - 10%. Высушенный комплексный пробиотический препарат измельчают при помощи бытовой мельницы.

Готовый пробиотический препарат храниться в холодильнике при температуре  $(4\pm 2)^0$  и влажности не более 10% в течение одного года, при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

За отчетный период проведено по 5 выработок препаратов каждого штамма. Выход сухого препарата за одну выработку составил  $750\pm 30$  г, содержание жизнеспособных клеток использованных штаммов составило  $10^9 - 10^{10}$  КОЕ в одном грамме сухого препарата.

Литература.

1. Методические рекомендации «Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных» (пер. № 13-5-02/1043 от 11.05.2004)
2. Празднова Е.В. , Мазанко. М.С. , Золотухин П.В. , Харченко Е.Ю., Чистяков В.А., Арутюнов В.А., Козина Л.С. Роль остатка лизина в антиоксидантной и ДНК-протекторной активности олигопептидов//Успехи геронтологии (2016)№5 В ПЕЧАТИ
3. Algburi A., Zehm S., Natrebov V., Bren A. B., Chistyakov V., Chikindas M. L. (2016) Subtilisin prevents biofilm formation by 1 inhibiting bacterial quorum sensing// Probiotics and Antimicrobial Proteins
4. Algburi, A., Volski, A. and Chikindas, M.L. (2015) Natural Antimicrobials Subtilisin and Lauramide Arginine Ethyl Ester (LAE) Synergize with Conventional Antibiotics Clindamycin and Metronidazole against Biofilms of *Gardnerella vaginalis* but Not against Biofilms of Healthy Vaginal Lactobacilli. Pathogens and Disease, 73, ftv018.
5. Chistyakov, V., Melnikov, V., Chikindas, M.L., Khutsishvili, M., Chagelishvili, A., Bren, A., Kostina. N., Cavera, V. and Elisashvili, V. (2015) Poultry-Beneficial Solid-State *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 Fermented Soybean Formulation. Bioscience of Microbiota, Food and Health, 3, 25-28. <http://dx.doi.org/10.12938/bmfh.2014-012>
6. Colagiorgi A., Di Ciccio P., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix// Microorganisms. 2016 4(3). pii: E22. doi: 10.3390/microorganisms4030022.
7. Golovko, G.V., Zipelt, L.I., Karpenko, G.I., Chistyakov, V.A., Sazykina, M.A. and Kolenko, M.A. (2008) Method for Growth of Young Azov-Chernomorskaya Royal Fish in Ponds. RU Patent No. 2376755.
8. Machado D., Castro J., Palmeira-de-Oliveira A., Martinez-de-Oliveira J., Cerca N. Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions// Front Microbiol. 2016 6 pp 1528. doi: 10.3389/fmicb.2015.01528. eCollection
9. Pessione E., Cirrincione S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines// Front Microbiol. 2016 №7, pp 876-895. doi: 10.3389/fmicb.2016.00876. eCollection 2016.
10. Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Churilov M.N., Mazanko M.S., Bren A.B., Volski A., Chikindas M.L. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933. Lett Appl Microbiol. 2015 Dec;61(6):549-54. doi: 10.1111/lam.12491.

11. Sharma V.K., Bearson S.M., Bearson B.L. Evaluation of the effects of sdiA, a luxR homologue, on adherence and motility of Escherichia coli O157 : H7// Microbiology. 2010 156(5): pp1303-1312. doi: 10.1099/mic.0.0343
12. Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA et al (2008) Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus subtilis* strain *amyloliquefaciens*. J Appl Microbiol 104:1067-1074. doi:10.1111/j.1365-3182.2007.03626.x
13. Sutyak, K.E., Wirawan, R.E., Aroutcheva, A.A. and Chikindas, M.L. (2008) Isolation of the *Bacillus subtilis* Antimicrobial Peptide Subtilosin from the Dairy Product-Derived *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Applied Microbiology, 104, 1067-1074. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03626.x>
14. Wattanavanitchakorn S, Prakitchaiwattana C, Thamyongkit P (2014) Rapid and simple colorimetric method for the quantification of AI-2 produced from *Salmonella Typhimurium*. J Microbiol methods 99:15-21. doi: 10.1016/j.mimet.2014.01.014