

УДК: 579.62

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.26

РАЗРАБОТКА УНИФИЦИРОВАННОЙ КИШЕЧНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ

Шебеко С.К.^{1*} – д-р. фарм. наук, проф., зав. каф. биотехнические и медицинские системы и технологии (ORCID 0000-0001-9350-7588); **Тихменева Ю.А.**¹ – асп. (ORCID 0000-0002-0339-8187); **Сандулян К.В.**² – студ. (ORCID 0000-0002-8832-5875); **Ермаков А.М.**¹ – д-р. биол. наук, проф., декан факультета биоинженерия и ветеринарная медицина (ORCID 0000-0002-9834-3989).

¹ ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет»

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»

* shebeko_sk@mail.ru

Ключевые слова: питательные среды, универсальная искусственная кишечная среда, разработка состава, кишечная микробиота, микробиологическое исследование.

Key words: *nutrient media, universal artificial intestinal medium, composition development, intestinal microbiota, microbiological research.*

Финансирование: Материалы подготовлены в рамках реализации государственного задания "Молекулярные механизмы взаимодействия сообществ кишечных микроорганизмов *in vivo* и *in vitro* на базе автоматизированной системы имитации ЖКТ свиньи" (номер ЕГИСУ НИОКР FZNE-2024-0013).

Поступила: 08.11.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

Искусственные кишечные среды высоко востребованы в микробиологических исследованиях в сфере ветеринарии, поскольку позволяют получить качественный и количественный состав микробиоты, соответствующий естественным условиям. Единственная искусственная кишечная среда, имеющаяся на сегодняшний день в отечественной микробиологической практике, не валидирована и её применение ограничивается культивированием лактобактерий. В связи с этим, научный интерес представляет разработка унифицированной искусственной кишечной среды (УИКС), максимально соответствующей естественным условиям кишечника, на примере кур породы Браун Ник, для эффективного культивирования микроорганизмов при проведении микробиологических исследований в ветеринарии. В ходе проведенных исследований были проанализированы существующие искусственные кишечные среды и выбраны ключевые компоненты для УИКС, включающие пектин, ксилан, арабиногалактан, амилопектин, казеин, крахмал, бактопептон, соли и витамины, что обеспечивает воспроизведение естественных условий кишечника. Для проверки эффективности среды отобрали десять образцов фекалий кур, пять из которых инкубировали в условиях УИКС, а другие пять культивировали без применения среды. Полученные бактериальные культуры были идентифицированы и количественно проанализированы с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF и метода посева на селективные среды. Статистический анализ показал отсутствие значимых различий в составе микробиоты меж-

ду экспериментальными группами ($p > 0,05$), что указывает на успешное воспроизведение условий кишечника с использованием УИКС. Настоящее исследование демонстрирует потенциал УИКС для культивирования кишечной микробиоты и может стать основой для дальнейших исследований, направленных на моделирование условий кишечника при разработке лекарственных препаратов и кормов в ветеринарии.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Искусственные кишечные среды (ИКС) – это особые питательные среды, которые имитируют внутреннее кишечное содержимое, что позволяет получить качественный и количественный состав микробиоты в таких соотношениях, в которых они присутствуют в настоящем кишечнике. Применение ИКС позволяет изучать влияние микробиоты, в том числе патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, друг на друга, а также лекарственных веществ на них. Поэтому актуальной является разработка валидированных кишечных сред для микробиологических исследований.

По состоянию на 2023 год в России существовала только одна ИКС, имитирующая условия кишечника курицы [1]. Однако её валидация была проведена с использованием lux-биосенсоров, которые не считаются признанным методом для изучения микробиоты. Поэтому нельзя утверждать, что данная ИКС прошла полноценную валидацию. Более того, в рамках исходного исследования на этой среде культивировались исключительно лактобациллы, тогда как микробиота кишечника курицы включает в себя и другие бактериальные роды. Это затрудняет оценку того, насколько условия в ИКС отвечают потребностям остальных представителей микробиоты.

Стандартные питательные среды (Блаурокка, агар для анаэробов с антибиотиками, Вильсона-Блэра, MRS, Эндо, Плоскирева, энтерококковый агар, кровяной агар, желточно-солевой агар, скошенный МПА, Сабуро) широко применяются для диагностики инфекционных заболеваний, включая поражения пищеварительного тракта. Однако каждая из них поддерживает рост лишь одного или нескольких родов микроорганизмов. Так, например, на среде Эндо можно выращивать только представителей семейства энте-

робактерий [2].

Таким образом, единственная ИКС, разработанная в России, не является валидированной, и её применение ограничивается лактобациллами. Стандартные же питательные среды не позволяют культивировать всю кишечную микробиоту в одной пробирке. В связи с этим научный интерес представляет разработка кишечной среды для широкого применения в микробиологических исследованиях в сфере ветеринарии.

Целью научно-исследовательской работы стала разработка унифицированной искусственной кишечной среды (УИКС) на основе изученного биохимического состава естественного кишечного содержимого кур породы Браун Ник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Для приготовления 1 л УИКС к 1 л дистиллированной воды добавляли (в граммах) 9,0 пектина, 9,0 ксилана, 9,0 арабиногалактана, 9,0 амилопектина, 43,7 казеина, 74,6 крахмала, 31,5 твина 80, 43,7 бактопептона, 0,7 бычьей желчи стерильной, 4,7 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 8,4 NaCl, 0,009 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,8 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02 гемина, 0,2 п-аминобензойной кислоты. Затем полученную смесь автоклавировали при температуре 134 °C и давлении 2 атмосферы в течение 30 минут. После автоклавирования добавляли 4,0 г стерильного коммерческого муцина желудка свиньи, 2,5 г никотинамида, 4 мг тиамин и 3 мг цистеин-HCl для избегания их разрушения. В случае использования УИКС свыше 72 часов в нее дополнительно вводили 1,5 мл витаминной смеси, содержащей (на 1 л): 1 мг менадиона, 2 мг D-биотина, 0,5 мг витамина B12, 10 мг пантотеновой кислоты, 4 мг тиамин и 5 мг никотинамидной кислоты.

Образцы хранили при двух температурных режимах: часть в холодильнике

при 4 °С в течение 72 часов, другую часть — в термостате при 35 °С в течение того же времени. Для подтверждения эффективности автоклавирования был проведён бактериологический контроль стерильности в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности», в результате которого роста бактериальных культур в образцах выявлено не было.

Десять образцов фекалий кур породы Браун Ник были отобраны из коллекции лаборатории «Центр Агробиотехнологии» ДГТУ. Пять из них культивировали непосредственно в разработанной УИКС, остальные — без предварительного культивирования. Для селективного выращивания различных бактериальных групп использовались следующие питательные среды:

- бифидобактерии — молочно-растительная среда;
- энтерококки — энтерококковый агар;
- кишечные палочки и лактозопозитивные бактерии — среда Эндо.

Посев проводился согласно методическим указаниям МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Методика посева включала предварительное обозначение типа питательной среды и номера образца на дне чашки Петри. Затем бактериологическую петлю стерилизовали над спиртовкой, открывали пробирку с образцом фекалий, прокалывали ее края, охлаждали петлю о стенки пробирки и переносили исследуемый материал на питательную среду, распределяя его по секторам. После закрытия чашки Петри посева помещали в анаэробстат, поддерживая температуру 37°С в течение 72 часов, с созданием анаэробных условий с помощью газовой смеси (80% азота, 10% водорода и 10% углекислого газа).

Для определения видового состава бактерий применяли MALDI-TOF масс-спектрометрию. Размножение бактерий проводили на агаре Лурия, а количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на

грамм рассчитывали на фунт-агаре. В ходе культивирования морфологически наблюдали колонии бактерий среди других видов. Колонии бактерий исследовали под микроскопом. Для определения количества спор в образце бактерий выделяли две аликвоты: одну пастеризовали при 90°С в течение 5 минут, чтобы убить вегетативные клетки и оставить только споры, которые затем высевали на агар Лурия для подсчета КОЕ/г. Вторую аликвоту инкубировали при +4°С в течение 24 часов для стимуляции споруляции, затем снова пастеризовали и считали споры, проросшие из спорообразующих бактерий. Разность между результатами первой и второй аликвот позволила оценить количество спорообразующих бактерий, а общий посев непастеризованного образца давал общий показатель КОЕ/г.

Результаты обрабатывали методами описательной статистики и проверяли на нормальность по критерию Шапиро-Уилка. Статистический анализ межгрупповых различий проводили методом ANOVA с апостериорным тестом Тьюки для нормально распределенных данных или с использованием критерия Манна-Уитни в противоположном случае. Вычисления производили с помощью программ IBM SPSS Statistics v. 22 ("IBM Corp.", США) и MS Excel 2016 ("Microsoft Corp.", США). Различия показателей считали статистически значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

На основании данных научной литературы был подобран следующий состав УИКС (г/л): пектин – 9,0, ксилан – 9,0, арабиногалактан – 9,0, амилопектин – 9,0, казеин – 43,7, крахмал – 74,6, твин-80 – 31,5, бактопептон – 43,7, бычья желчь стерильная – 0,7, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 4,7, NaCl – 8,4, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,009, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,7, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,8, гемин – 0,02, *p*-аминобензойная кислота – 0,2. После автоклавирования полученной смеси в нее добавляли 4,0 г стерильного коммерческого муцина желудка свиньи, 2,5 г никотинамида, 4 мг тиамин и 3 мг цистеин-HCl для избегания их разрушения. В

случае использования УИКС свыше 72 часов было определено, что в нее целесообразно добавлять 1,5 мл витаминной смеси, содержащей (на 1 л): 1 мг менадиона, 2 мг D-биотина, 0,5 мг витамина B12, 10 мг пантотеновой кислоты, 4 мг тиамин и 5 мг никотинамидной кислоты.

При подборе состава УИКС исходили из того, что характер питания кур и вещества, которые поступают в их кишечник, регулируют рост и метаболическую активность микробиоты, обуславливают определенные физиологические характеристики внутренней среды, которые должны быть сымитированы в представленной разработке.

За основу разработки была взята зарубежная валидированная кишечная среда SIEM, которая хорошо себя зарекомендовала при проведении различных исследований в искусственной динамической модели толстой кишки TIM-2 [3]. SIEM состоит из 2,5 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 4,5 г/л NaCl, 0,005 г/л $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,45 г/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,05 г/л желчи и 0,4 г/л цистеин-HCl. Также в нее добавляется 1 мл витаминной смеси, содержащей 1 мг/л менадиона, 2 мг/л D-биотина, 0,5 мг/л витамина B12, 10 мг/л пантотената, 5 мг/л никотинамида, 5 мг/л п-аминобензойной кислоты и 4 мг/л тиамина. Данная среда позитивно влияет на естественный баланс микробного сообщества, позволяя максимально близко воспроизвести нормальные условия толстого кишечника. Однако же состав SIEM не учитывает в полной мере особенности питания кур. В связи с этим в нее целесообразно было включить нижеописанные компоненты для достижения определенных свойств УИКС.

В качестве углевода был выбран ксилан, поскольку он входит в состав злаковых и является субстратом для жизнедеятельности бифидобактерий, например, *Bifidobacterium longum* и продуцентов бутирата, например, *Faecalibacterium prausnitzii* [4]. Пектин является субстратом для семейства *Firmicutes* [5], а арабиногалактан, содержащийся в твердых частях растений и входящий в рацион жи-

вотных и человека, стимулирует рост пробиотической микробиоты [6]. Амилопектин обуславливает рост облигатной микробиоты [7]. Казеин является источником аминокислот для микробиоты, которые входят в состав бактериальных белков, ферментов и биологически активных веществ [8]. Крахмал является предшественником амилопектина, модулирует рост резидентной микробиоты [9]. Твин-80 необходим для профилактики вспенивания УИКС, является субстратом для микробиоты, выполняет дезинтоксикационную функцию [10]. Бактопептон в процессе метаболизма обогащает микробиоту азотом, который необходим для синтеза пуринов и пиримидинов [11]. Стерильная бычья желчь – субстрат для синтеза бактериальных стероидов, препятствует избыточному росту микробиоты [12]. Менадион участвует в культивировании патогенной микробиоты, которая также присутствует в кишечнике в определенном количестве. Гемин участвует в образовании бактериальных уролитинов, имеет антиоксидантные свойства [13]. Парааминобензойная кислота необходима для реакций матричного синтеза в бактериальной клетке и образования биопленок [14]. Тиамин – экзогенный кофермент, необходимый для синтеза декарбоксилаз [15]. Никотинамидная кислота необходима для репарации ДНК, является кофактором ферментных комплексов [16]. Коммерческий муцин желудка свиньи необходим для имитации нормальной слизи. Цистеин – донор сульфгидрильных групп, восстановитель, образует регуляторные комплексы [17]. D-биотин участвует в синтезе карбоксилаз, образовании зародышевых трубок и грибов [18]. Витамин B12 участвует в реакциях трансметилирования и синтезе нуклеотидов [19]. Пантотенат входит в состав трансфераз и ацетил-КоА [20].

С целью тестирования разработанной УИКС из коллекции научно-исследовательской лаборатории «Центр Агробиотехнологии» ДГТУ были отобраны десять образцов фекалий кур породы Браун Ник. Пять образцов использовали

для бактериологического посева без предварительного культивирования в разрабатываемой УИКС, а остальные пять — для культивирования кишечных бактерий с использованием УИКС.

Для культивирования молочнокислых бактерий применяли селективные питательные среды: бифидобактерии выращи-

вали на молочно-растительной среде, энтерококки — на энтерококковом агаре, а кишечные палочки и лактозопозитивные бактерии — на среде Эндо.

По итогам исследования были определены родовой состав и численность бактерий в образцах фекалий кур, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Родовой состав и численность микробиоты, выращенной на селективных питательных средах

Род	КОЕ/г	Стандартная ошибка
<i>Lactobacillus</i>	$3,5 \cdot 10^8$	0,4
<i>Bifidobacterium</i>	$1,0 \cdot 10^7$	0,0
<i>Enterococcus</i>	$1,4 \cdot 10^7$	0,3
<i>Escherichia coli</i>	$4,8 \cdot 10^6$	1,1
Лактозо-позитивные бактерии	$4,4 \cdot 10^5$	1,1
<i>Bacillus</i>	0	0

Таблица 2 – Родовой состав и численность микробиоты, выращенной на УИКС

Род	КОЕ/г	Стандартная ошибка
<i>Lactobacillus</i>	$3,8 \cdot 10^8$	0,5
<i>Bifidobacterium</i>	$1,0 \cdot 10^7$	0,0
<i>Enterococcus</i>	$1,4 \cdot 10^7$	0,1
<i>Escherichia coli</i>	$4,8 \cdot 10^6$	1,3
Лактозо-позитивные бактерии	$4,3 \cdot 10^5$	1,2
<i>Bacillus</i>	0	0

Для культивирования кишечных бактерий при помощи разрабатываемой среды пять образцов фекалий кур были помещены в стеклянную колбу с автоклавированной УИКС и икубировались 24 часа в анаэробных условиях в термостате при температуре 41 °С с контролем рН в диапазоне от 6,8 до 7,6, что соответствует нормальной температуре и рН слепой кишки курицы. Далее полученное содержимое было разликвотировано в асептических условиях для бактериальных посевов, родовой идентификации и количественного анализа в соответствии с вышеописанными методами.

В результате у образцов, культивированных с применением разрабатываемой УИКС также был определен родовой состав кишечных бактерий (таблица 2).

Полученные данные были использованы для проверки различий в составе кишечной микробиоты в образцах с предва-

рительным культивированием с применением УИКС и без. Согласно критерию Шапиро-Уилка, полученные данные не подчинялись нормальному распределению, в связи с чем для проверки разницы в количественном составе родов кишечных бактерий был использован критерий Манна-Уитни. По результатам проверки статистических гипотез значимой разницы между составом микробиоты обнаружено не было ($p > 0,05$), что свидетельствует об успешности воспроизведения кишечных условий с применением разрабатываемой УИКС.

Таким образом, разработанная УИКС состоит из широкого спектра белков, жиров, углеводов, солей и витаминов, за счет чего происходит удовлетворение внешних и внутренних потребностей широкого спектра бактерий, культивируемых в кишечнике, следовательно, это обуславливает рост большего количества

фил бактерий. Все вышеизложенное делает разработанную УИКС более точной моделью приближения к среде кишечника.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате проведенных исследований был подобран состав и создан экспериментальный образец УИКС с учетом особенностей питания и физиологических параметров кишечника кур породы Браун Ник. Была апробирована возможность автоклавирования экспериментального образца УИКС. Было обнаружено, что соли, белки и углеводы выдерживают автоклавирование, а свиной желудочный муцин и витаминный комплекс должны вводиться в стерильном виде после этого. Разработанная УИКС была протестирована путем культивирования в ней микробиоты из образцов фекалий кур в сравнении с культивированием на селективных питательных средах. Статистически значимых различий между численностью бактерий, выращенных на селективных питательных средах и УИКС выявлено не было, что говорит о качественном воспроизведении условий кишечника кур с применением разработанной УИКС.

DEVELOPMENT OF THE UNIFIED INTESTINAL MEDIUM FOR MICROBIOLOGICAL RESEARCH IN VETERINARY MEDICINE

Shebeko S.K.^{1*} – Doctor of Pharmacy, Prof., Head of the Department of Bioengineering and Medical Systems and Technologies (ORCID 0000-0001-9350-7588); **Tikhmeneva Iu.A.**¹ – postgraduate student (ORCID 0000-0002-0339-8187); **Sandulian K.V.**² – student (ORCID 0000-0002-8832-5875); **Ermakov A.M.**¹ – Doctor of Biology, Prof., Dean of the Faculty of Bioengineering and Veterinary Medicine (ORCID 0000-0002-9834-3989).

¹Don State Technical University

²Rostov State Medical University

* shebeko_sk@mail.ru

Financing: The materials were prepared

as part of the implementation of the state task "Molecular mechanisms of interaction of communities of intestinal microorganisms in vivo and in vitro based on an automated system for simulating the pig gastrointestinal tract" (number EGISU R&D FZNE-2024-0013)..

ABSTRACT

Artificial intestinal media are in high demand in microbiological research in the field of veterinary medicine, since they allow obtaining a qualitative and quantitative composition of microbiota corresponding to the natural conditions. The only artificial intestinal medium currently available in domestic microbiological practice has not been validated and its use is limited to the cultivation of lactobacilli. In this regard, the development of a unified artificial intestinal medium (UAIM) that best matches the natural conditions of the intestine, using the example of Brown Nick chickens, is of scientific interest for the effective cultivation of microorganisms during microbiological research in veterinary medicine. In the course of the studies, existing artificial intestinal media were analyzed and key components were selected, including pectin, xylan, arabinogalactan, amylopectin, casein, starch, bactopectone, salts and vitamins, which ensures the reproduction of natural intestinal conditions. To test the effectiveness of the medium, ten samples of chicken feces were selected, five of which were incubated under UAIM conditions, and the other five were cultured without the use of the medium. The resulting bacterial cultures were identified and quantitatively analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry and the method of seeding on selective media. Statistical analysis showed no significant differences in the microbiota composition between the experimental groups ($p > 0.05$), indicating that the intestinal conditions were successfully reproduced using UAIM. This study demonstrates the potential of UAIM for culturing intestinal microbiota and can serve as a basis for further studies aimed at modeling intestinal conditions in the development of veterinary drugs and feeds.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mazanko, M.S. Antioxidant and antimutagenic properties of probiotic Lactobacilli determined using LUX-biosensors / M.S. Mazanko, E.V. Prazdnova, M.P. Kulikov [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* 2022:155:109980. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109980>.
2. Kaminsky, D.L. Evaluation of nutrient media to grow some infection diseases causative agents / D.L. Kaminsky, V.V. Lobanov, K.K. Rozhkov, A.B. Mazrukho // *Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol.* 2017. Vol. 94 (2), P. 104-110.
3. Maas, E. Investigating the survival and activity of a bacteriophage in the complex colon environment with the use of a dynamic model of the colon (TIM-2) / E. Maas, J. Penders, K. Venema // *Microbial Pathogenesis.* 2023:178(3):106061.
4. Butardo, V.M. Chapter Two - Tailoring Grain Storage Reserves for a Healthier Rice Diet and its Comparative Status with Other Cereals / V.M. Butardo, N. Sreenivasulu // *International Review of Cell and Molecular Biology.* 2016:323:31-70.
5. Blanco-Pérez, F. The Dietary Fiber Pectin: Health Benefits and Potential for the Treatment of Allergies by Modulation of Gut Microbiota / F. Blanco-Pérez, H. Steigerwald, S. Schülke [et al.] // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2021:21(10):43. – DOI: [10.1007/s11882-021-01020-z](https://doi.org/10.1007/s11882-021-01020-z).
6. Kiyoto, S. Distribution of Lignin, Hemicellulose, and Arabinogalactan Protein in Hemp Phloem Fibers / S. Kiyoto, A. Yoshinaga, E. Fernandez-Tendero [et al.] // *Microsc. Microanal.* 2018:24(4):442-452. – DOI: [10.1017/S1431927618012448](https://doi.org/10.1017/S1431927618012448).
7. Yang, Z. Dietary amylose and amylopectin ratio changes starch digestion and intestinal microbiota diversity in goslings / Z. Yang, C. Xu, W. Wang [et al.] // *Br. Poult. Sci.* 2022:63(5):691-700. – DOI: [10.1080/00071668.2022.2079398](https://doi.org/10.1080/00071668.2022.2079398).
8. Solihin, J. Induction of amylase and protease as antibiofilm agents by starch, casein, and yeast extract in *Arthrobacter* sp. CW01 / J. Solihin, D.E. Waturangi, T. Purwadaria // *BMC Microbiol.* 2021:21(1):232. – DOI: [10.1186/s12866-021-02294-z](https://doi.org/10.1186/s12866-021-02294-z).
9. Seung, D. Amylose in starch: towards an understanding of biosynthesis, structure and function / D. Seung // *New Phytol.* 2020:228(5):1490-1504. – DOI: [10.1111/nph.16858](https://doi.org/10.1111/nph.16858).
10. Favero, M.S. Microbiological sampling of surfaces / M.S. Favero, J.J. McDade, J.A. Robertsen [et al.] // *J. Appl. Bacteriol.* 1968:31(3):336-343. – DOI: [10.1111/j.1365-2672.1968.tb00375.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1968.tb00375.x).
11. Abou Dohara, M.I. Production and partial characterization of high molecular weight extracellular alpha-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* isolated from Egyptian soil / M.I. Abou Dohara, A.K. El-Sayed, A.A. El-Fallal, N.F. Omar // *Polish J. Microbiol.* 2011:60(1):65-71.
12. Campbell, C. Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells / C. Campbell, P. T. McKenney, D. Konstantinovskiy [et al.] // *Nature.* 2020:581(7809):475-479. – DOI: [10.1038/s41586-020-2193-0](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2193-0).
13. Piwowarski, J.P. Differences in Metabolism of Ellagitannins by Human Gut Microbiota Ex Vivo Cultures / J.P. Piwowarski, S. Granica, J. Stefańska, A.K. Kiss // *J. Nat. Prod.* 2016:79(12):3022-3030. – DOI: [10.1021/acs.jnatprod.6b00602](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00602).
14. Dial, C.N. Para-Aminobenzoic Acid, Calcium, and c-di-GMP Induce Formation of Cohesive, Syp-Polysaccharide-Dependent Biofilms in *Vibrio fischeri* / C.N. Dial, L. Speare, G.C. Sharpe [et al.] // *MBio.* 2021:12(5): e0203421. – DOI: [10.1128/mBio.02034-21](https://doi.org/10.1128/mBio.02034-21).
15. Nosaka, K. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Nosaka // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006:72(1):30-40. – DOI: [10.1007/s00253-006-0464-9](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0464-9).
16. Shats, I. Bacteria Boost Mammalian Host NAD Metabolism by Engaging the Deamidated Biosynthesis Pathway / I. Shats, J. G. Williams, J. Liu [et al.] // *Cell Metab.* 2020:31(3):564-579.e7. – DOI: [10.1016/j.cmet.2020.02.001](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.001).
17. Takagi, H. L-Cysteine Metabolism and Fermentation in Microorganisms / Takagi H., Ohtsu I. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2017:159:129-151. – DOI:

- 10.1007/10_2016_29.
18. Satiaputra, J. Biotin-mediated growth and gene expression in *Staphylococcus aureus* is highly responsive to environmental biotin / J. Satiaputra, B.A. Eijkelkamp, C.A. McDevitt [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018:102(8):3793-3803. – DOI: 10.1007/s00253-018-8866-z.
19. Hou, H. Epigenetic factors in atherosclerosis: DNA methylation, folic acid metabolism, and intestinal microbiota / Hou H., Zhao H. // *Clin. Chim. Acta.* 2021:512:7-11. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.11.013>.
20. Tahiliani, A.G. Pantothenic acid in health and disease / Tahiliani A.G., Beinlich C.J. // *Vitam. Horm.*, 1991:46:165-228. – DOI: 10.1016/s0083-6729(08)60684-6.
- ### REFERENCES
1. Mazanko, M.S. Antioxidant and antimutagenic properties of probiotic *Lactobacilli* determined using LUX-biosensors / M.S. Mazanko, E.V. Prazdnova, M.P. Kulikov [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* 2022:155:109980. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109980>.
2. Kaminsky, D.L. Evaluation of nutrient media to grow some infection diseases causative agents / D.L. Kaminsky, V.V. Lobanov, K.K. Rozhkov, A.B. Mazrukho // *Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol.* 2017. Vol. 94 (2), P. 104-110.
3. Maas, E. Investigating the survival and activity of a bacteriophage in the complex colon environment with the use of a dynamic model of the colon (TIM-2) / E. Maas, J. Penders, K. Venema // *Microbial Pathogenesis.* 2023:178(3):106061.
4. Butardo, V.M. Chapter Two - Tailoring Grain Storage Reserves for a Healthier Rice Diet and its Comparative Status with Other Cereals / V.M. Butardo, N. Sreenivasulu // *International Review of Cell and Molecular Biology.* 2016:323:31-70.
5. Blanco-Pérez, F. The Dietary Fiber Pectin: Health Benefits and Potential for the Treatment of Allergies by Modulation of Gut Microbiota / F. Blanco-Pérez, H. Steigerwald, S. Schülke [et al.] // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2021:21(10):43. – DOI: 10.1007/s11882-021-01020-z.
6. Kiyoto, S. Distribution of Lignin, Hemicellulose, and Arabinogalactan Protein in Hemp Phloem Fibers / S. Kiyoto, A. Yoshinaga, E. Fernandez-Tendero [et al.] // *Microsc. Microanal.* 2018:24(4):442-452. – DOI: 10.1017/S1431927618012448.
7. Yang, Z. Dietary amylose and amylopectin ratio changes starch digestion and intestinal microbiota diversity in goslings / Z. Yang, C. Xu, W. Wang [et al.] // *Br. Poult. Sci.* 2022:63(5):691-700. – DOI: 10.1080/00071668.2022.2079398.
8. Solihin, J. Induction of amylase and protease as antibiofilm agents by starch, casein, and yeast extract in *Arthrobacter* sp. CW01 / J. Solihin, D.E. Waturangi, T. Purwadaria // *BMC Microbiol.* 2021:21(1):232. – DOI: 10.1186/s12866-021-02294-z.
9. Seung, D. Amylose in starch: towards an understanding of biosynthesis, structure and function / D. Seung // *New Phytol.* 2020:228(5):1490-1504. – DOI: 10.1111/nph.16858.
10. Favero, M.S. Microbiological sampling of surfaces / M.S. Favero, J.J. McDade, J.A. Robertsen [et al.] // *J. Appl. Bacteriol.* 1968:31(3):336-343. – DOI: 10.1111/j.1365-2672.1968.tb00375.x.
11. Abou Dohara, M.I. Production and partial characterization of high molecular weight extracellular alpha-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* isolated from Egyptian soil / M.I. Abou Dohara, A.K. El-Sayed, A.A. El-Fallal, N.F. Omar // *Polish J. Microbiol.* 2011:60(1):65-71.
12. Campbell, C. Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells / C. Campbell, P. T. McKenney, D. Konstantinovskiy [et al.] // *Nature.* 2020:581(7809):475-479. – DOI: 10.1038/s41586-020-2193-0.
13. Piwowarski, J.P. Differences in Metabolism of Ellagitannins by Human Gut Microbiota ex Vivo Cultures / J.P. Piwowarski, S. Granica, J. Stefańska, A.K. Kiss // *J. Nat. Prod.* 2016:79(12):3022-3030. – DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00602.
14. Dial, C.N. Para-Aminobenzoic Acid, Calcium, and c-di-GMP Induce Formation of Cohesive, Syp-Polysaccharide-Dependent

- Biofilms in *Vibrio fischeri* / C.N. Dial, L. Speare, G.C. Sharpe [et al.] // MBio. 2021;12(5): e0203421. – DOI: 10.1128/mBio.02034-21.
15. Nosaka, K. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Nosaka // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006;72(1):30-40. – DOI: 10.1007/s00253-006-0464-9.
16. Shats, I. Bacteria Boost Mammalian Host NAD Metabolism by Engaging the Deamidated Biosynthesis Pathway / I. Shats, J. G. Williams, J. Liu [et al.] // Cell Metab. 2020;31(3):564-579.e7. – DOI: 10.1016/j.cmet.2020.02.001.
17. Takagi, H. L-Cysteine Metabolism and Fermentation in Microorganisms / Takagi H., Ohtsu I. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2017;159:129-151. – DOI: 10.1007/10_2016_29.
18. Satiaputra, J. Biotin-mediated growth and gene expression in *Staphylococcus aureus* is highly responsive to environmental biotin / J. Satiaputra, B.A. Eijkelkamp, C.A. McDevitt [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018;102(8):3793-3803. – DOI: 10.1007/s00253-018-8866-z.
19. Hou, H. Epigenetic factors in atherosclerosis: DNA methylation, folic acid metabolism, and intestinal microbiota / Hou H., Zhao H. // Clin. Chim. Acta. 2021;512:7-11. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.11.013>.
20. Tahiliani, A.G. Pantothenic acid in health and disease / Tahiliani A.G., Beinlich C.J. // Vitam. Horm., 1991;46:165-228. – DOI: 10.1016/s0083-6729(08)60684-6.