

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Донской государственный технический университет

На правах рукописи



ЯРУШНИКОВА ЮЛИЯ АНДРЕЕВНА

**МОДЕЛИРОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ СВИНЕЙ *IN VITRO* С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННОЙ КИШЕЧНОЙ СРЕДЫ**

4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и
токсикология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Ермаков Алексей Михайлович

Ростов-на-Дону – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Особенности строения ЖКТ свиней	17
1.1.1. Желудок	17
1.1.2. Тонкий отдел кишечника	18
1.1.3. Поджелудочная железа	19
1.1.4. Печень	19
1.1.5. Толстый отдел кишечника	20
1.2. Особенности микробиоты ЖКТ свиней и ее роль в поддержании функционального состояния организма животного	21
1.3. Методы изучения микробиоты свиней	24
1.3.1. Молекулярно-генетические методы	24
1.3.2. Культуральные методы	29
1.3.3. Биохимические методы анализа метаболитов микробиоты	32
1.4. Роль микробиоты в развитии кишечных инфекций у свиней.	35
1.4.1. Вирус эпидемической диареи свиней	36
1.4.2. Африканская чума свиней	38
1.4.3. Дисбиоз при отъеме	40
1.5. Проблема антибиотикорезистентности в свиноводстве	43
1.6. Модели <i>in vitro</i> для изучения микробиоты свиней	46
1.6.1. Искусственные модели желудочно-кишечного тракта	46
1.6.2. Применение <i>in vitro</i> моделей для апробации антибиотиков, бактериофагов и пробиотиков	50
1.7. Ключевые параметры ЖКТ свиньи при <i>in vitro</i> моделировании кишечной микробиоты	52
1.8. Искусственные кишечные среды	57
1.8.1. Среда для модели PolyFermS (проксимальный отдел толстой кишки взрослых свиней)	58
1.8.2. Среда для модели baby-SPIME (поросята на подсосе)	59
1.8.3. Среда для модели Pigut-IVM (послеотъемные поросята)	60
1.8.4. Искусственная кишечная модель толстого кишечника поросят с муциновыми шариками (MPigut-IVM)	61
1.9. Заключение к обзору литературы	62
ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	64
2.1. Материалы и методы	64
2.1.1. Объекты исследования	64
2.1.2. Оборудование, реактивы и расходные материалы	65
2.1.2.1. Установка и ЖКТ	65

2.1.2.2. Реактивы и расходные материалы	67
2.1.3. Разработка кишечной среды	70
2.1.3.1. Приготовление	70
2.1.3.2. Стерилизация кишечной среды	71
2.1.4. Изучение физико-химических свойств искусственной кишечной среды	71
2.1.4.1. Реологические свойства	71
2.1.4.2. Определение pH среды	73
2.1.5. Аprobация в эксперименте искусственной кишечной среды	73
2.1.6. Изучение микробиоты свиней <i>in vivo</i>	74
2.1.6.1. Отбор проб кишечного содержимого свиней	74
2.1.6.2. Микробиологическое исследование кишечного содержимого свиней	75
2.1.6.3. Исследование проб методом ПЦР-РВ нативных образцов	78
2.1.6.4. Биохимическое исследование кишечного содержимого свиней	81
2.1.6.5. Определение метагеномных профилей сообществ микроорганизмов из нативного материала свиньи	82
2.1.7. Моделирование микробиоты свиней <i>in vitro</i>	84
2.1.7.1. Запуск иЖКТ	84
2.1.7.2. Микробиологическое исследование проб из иЖКТ	85
2.1.7.3. Биохимическое исследование проб из иЖКТ	86
2.1.7.4. Исследование проб методом ПЦР-РВ из иЖКТ	86
2.1.7.5. Фенотипическое определение антибиотикочувствительности	86
2.1.8. Моделирование дисбиоза на фоне антибиотикотерапии <i>in vitro</i>	88
2.1.8.1. Отбор проб свиньи	88
2.1.8.2. Запуск иЖКТ	88
2.1.8.3. Алгоритм внесения проб и препаратов в биореактор	89
2.1.8.4. Микробиологическое исследование проб из нативного материала и иЖКТ	90
2.1.8.5. Исследование проб методом ПЦР-РВ из нативного материала и иЖКТ	91
2.1.9. Статистическая обработка полученных результатов	92
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	94
3.1. Изучение физико-химических свойств кишечного содержимого свиней	94
3.1.1. Изучение реологических свойств кишечного химуса	94
3.1.2. Изучение pH искусственной кишечной среды	99
3.2. Исследование нативного кишечного содержимого методом определения метагеномных профилей сообществ микроорганизмов в отделах желудочно-кишечного тракта свиньи	100
3.3. Результаты аprobации ИКС на модели иЖКТ свиньи	106
3.3.1. Условия эксперимента для культивирования	106
3.3.2. Моделирование кишечной микробиоты свиньи <i>in vitro</i> в автоматизированной системе имитации желудочно-кишечного тракта	111
3.3.3. Изучение коррекции дисбиоза кишечной микробиоты свиней в модели искусственного желудочно-кишечного тракта	119

3.4. Обсуждение результатов исследования	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	130
ВЫВОДЫ	131
ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	132
РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	133
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	135
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	137
Приложение А.....	158

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В развивающихся странах ежегодно увеличивается спрос на животный белок. Одним из ключевых факторов увеличения производства мяса является развитие биотехнологий. Но вместе с тем появляется необходимость поиска инструментов для более эффективного производства и обеспечения биологической безопасности (Van Eenennaam A. L., Young A. E., 2015). Российская Федерация занимает пятое место в мире по производству свинины. При этом на внутреннем рынке доля свиноводства занимает 33-34% (Костенко О. В., Васенина Е. Н., 2019). Состав и разнообразие микробного сообщества, а также состояние желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) напрямую влияют на здоровье и продуктивность животных. (Myer P. R. et al., 2017). Нарушения в развитии микробного сообщества могут приводить к снижению продуктивности, росту заболеваемости и формированию антибиотикорезистентности.

Микробиота свиней рассматривается как динамичное, пространственно организованное сообщество микроорганизмов, населяющих различные отделы ЖКТ и включающих преимущественно бактерии, а также археи, грибы, простейшие и вирусы. (Ma Y. et al., 2026).

Состав и функциональная активность кишечной микробиоты свиней зависят от комплекса факторов, среди которых ведущая роль принадлежит рациону и кормовым добавкам (Myer P. R. et al., 2017). Нутриенты, поступающие с кормом, являются субстратами для микробной ферментации и определяют количественное соотношение, метаболическую активность и устойчивость отдельных таксонов микроорганизмов (Рассолов С. Н., Еранов А. М., 2012). В связи с этим коррекция микробного состава ЖКТ может осуществляться путем направленного изменения состава рациона, применения про-, пре-, метабиотиков и других биологически активных кормовых компонентов (Попов Г. А. с соавт., 2020).

Особое место среди факторов, определяющих состояние кишечной микробиоты, занимают антибиотики. Наряду с терапевтическим и

профилактическим применением в животноводстве их длительное время использовали в субтерапевтических дозах как кормовые стимуляторы роста для повышения приростов и улучшения конверсии корма. Однако постоянное селективное давление антибиотиков на кишечную микробиоту способствует угнетению облигатной флоры, нарушению межмикробных взаимодействий и формированию антибиотикорезистентности (Черкашина Н. В. с соавт., 2011). Поэтому поиск эффективных альтернатив антибиотическим стимуляторам роста, а также научное обоснование схем применения пробиотических, пребиотических и метабиотических средств приобретают особую актуальность.

В ответ на эти вызовы современные международные и Российские требования к производству ветеринарных препаратов и кормовых добавок предполагают отказ от стимуляторов роста антибиотической природы и внедрение альтернатив, что требует их тщательного скрининга. Вместе с тем проведение многоэтапных исследований непосредственно на животных сопряжено со значительными материальными и временными затратами, сложностью стандартизации условий опыта и необходимостью соблюдения принципов биоэтики на всех этапах разработки (Gadde et al., 2017.).

Для изучения этих процессов необходимы модельные системы, способные воспроизводить сложные условия ЖКТ без проведения трудоемких и затратных экспериментов *in vivo* (Тихменева (Ярушникова) Ю.А. с соавт., 2026). Искусственные модели ЖКТ *in vitro* позволяют имитировать физиологические параметры различных отделов пищеварительного тракта (желудка, тонкого и толстого кишечника), контролировать факторы внешней среды и получать воспроизводимые результаты (Шебеко С. К., Тихменева (Ярушникова) Ю. А., Ермаков А. М., 2024). Такие системы востребованы для оценки влияния кормов, а также служат важным инструментом контроля качества и оптимизации рецептур при промышленном производстве кормов и ветеринарных препаратов (Mountzouris et al., 2010; Левахин В.И. с соавт., 2013). Это позволяет выявлять закономерности функционирования микробиоты в условиях, максимально приближенных к

естественным, сокращая время и ресурсы, необходимые для вывода новой продукции на рынок.

Проблема исследования. Ключевой научной и практической проблемой, лежащей в основе данного исследования, является недостаточная разработанность видоспецифичных искусственных кишечных сред и унифицированных протоколов для моделирования микробиоты, регламентирующих параметры их использования и способных надежно воспроизводить условия, необходимые для функционирования микробиоты ЖКТ животных. Несмотря на наличие статических и динамических моделей пищеварительного тракта, состав питательных сред, режимы культивирования, критерии оценки устойчивости микробного сообщества и показатели соответствия физиологическим условиям ЖКТ свиней существенно различаются между исследованиями.

Отсутствие критериев достаточной функциональности *in vitro* моделей ЖКТ, которые позволяли бы моделировать микробные сообщества в условиях, близких к физиологическим, затрудняет сравнение результатов между лабораториями, снижает воспроизводимость данных и делает невозможным корректное использование конструктивно различных систем имитации пищеварительного тракта.

Степень разработанности темы исследования. К настоящему времени созданы статические, динамические и многоступенчатые *in vitro*-модели ЖКТ, предназначенные для воспроизведения процессов пищеварения, ферментации и функционирования кишечной микробиоты. В качестве методологических прототипов широко известны модели для воспроизведения процессов пищеварения человека SHIME и TIM (Van de Wiele T. et al., 2015, Cuevas-Tena M. et al., 2019). Для свиней созданы видоспецифичные системы, предназначенные для изучения переваривания кормов в верхних отделах ЖКТ и ферментации субстратов микробиотой толстого кишечника. Одним из таких подходов является непрерывная ферментационная система PolyFermS, воспроизводящая условия проксимального отдела ободочной кишки свиней. Модель позволяет стабильно поддерживать структуру и метаболическую активность микробного сообщества, а также

одновременно сравнивать действие нескольких кормовых факторов на единую исходную микробиоту (Gościński A. et al., 2022). Durif et al. (2025) для изучения кишечной микробиоты свиней разработали динамическую *in vitro* модель толстого кишечника взрослых свиней MPigut-IVM, которая является альтернативой экспериментам *in vivo*. Данные подходы позволяют контролировать основные физиологические параметры среды и проводить скрининговую оценку влияния рационов и кормовых добавок на микробиоту, ферментацию и образование ее метаболитов.

В последние десятилетия исследования микробиоты ЖКТ животных получили интенсивное развитие благодаря внедрению молекулярно-генетических методов. Наибольшее распространение получили метагеномные и метаболомные подходы, которые позволяют проводить комплексную оценку биоразнообразия и функциональной активности микробных сообществ. Метагеномика обеспечивает высокую точность анализа таксономического состава, включая некультивируемые виды, а также позволяет выявлять гены антибиотикорезистентности и факторы патогенности (Drissi et al., 2015; Feng et al., 2017). Вместе с тем молекулярно-генетические методы преимущественно характеризуют состав и функциональный потенциал микробиоты, тогда как для экспериментальной оценки ее ответной реакции на воздействие кормовых компонентов, антибиотиков и биотехнологических препаратов необходимы воспроизводимые модельные системы.

Одни из ранних подходов к *in vitro*-исследованию пищеварения у свиней были предложены Graham H. с соавт. (1989). Авторы использовали инкубацию образцов корма с забуференным дуоденальным содержимым в течение 12 часов, а также с забуференным илеальным и фекальным инокулятами в течение 48 часов. Результаты сопоставляли с показателями илеальной и фекальной переваримости, полученными *in vivo*. Показана возможность применения такого подхода для прогнозирования доступности крахмала и сырого протеина для переваривания в тонком кишечнике, а также ферментируемости пищевых волокон в дистальных отделах ЖКТ свиней.

Однако точность результатов, получаемых при *in vitro*-моделировании, определяется степенью соответствия искусственной среды физиологическим условиям ЖКТ животного. Поэтому актуальной задачей остается разработка и стандартизация кишечных сред, обеспечивающих воспроизведение химических, ферментативных и физико-химических параметров содержимого соответствующих отделов кишечника.

Научная гипотеза. Искусственная кишечная среда (ИКС), разработанная с учётом физико-химических, реологических, ферментативных и субстратных характеристик тонкого и толстого отделов кишечника свиней, может обеспечивать поддержание жизнеспособности и численности групп микроорганизмов в динамической *in vitro*-модели и позволяет использовать её для предварительной оценки влияния антимикробных препаратов и средств коррекции антибиотик-ассоциированных изменений микробиоты.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – разработать и апробировать искусственную кишечную среду для *in vitro*-моделирования кишечной микробиоты свиней.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

1. Определить минимальные ключевые параметры, характеризующие функциональную достаточность *in vitro*-модели для воспроизведения условий кишечной микробиоты ЖКТ свиней.
2. Разработать искусственную кишечную среду для *in vitro* моделирования кишечной микробиоты с разделением на тонко- и толстокишечный модуль, путем введения отделоспецифичных компонентов; провести оценку соответствия ее физико-химических свойств ключевым параметрам ЖКТ свиней.
3. Провести моделирование кишечной микробиоты свиней *in vitro* с использованием разработанной искусственной среды в динамических условиях системы имитации ЖКТ.
4. Оценить в эксперименте *in vitro* эффективность пробиотического препарата на основе *Bacillus subtilis* в условиях антибиотик-ассоциированного дисбиоза с использованием разработанной искусственной кишечной среды.

Объект исследования. Искусственная кишечная среда при моделировании микробиоты свиней *in vitro*.

Предмет исследования. Состав и физико-химические характеристики искусственной кишечной среды, обеспечивающие сохранение структуры и функциональной активности микробиоты свиней.

Научная новизна исследований. Впервые разработана и апробирована ИКС для *in vitro* моделирования условий тонкого и толстого отдела ЖКТ свиней.

Предложенная среда формирует комплекс условий культивирования, включающий углеводные и белковые субстраты, минеральные компоненты, витамины, муцин, желчь, ферментные препараты, гемин и восстановительный агент, обеспечивающий моделирование условий кишечной среды, приближенных к физиологическим по контролируемым показателям. Установлено, что введение отделоспецифичных компонентов в состав базовой ИКС позволяет воспроизводить контролируемые физико-химические и реологические условия, характерные для тонкого и толстого отделов кишечника свиней. В отличие от традиционных селективных сред, ИКС обеспечивает комплексное развитие микробного сообщества и поддерживает рост облигатных анаэробов.

Выполнено сопоставление таксономического состава и разнообразия кишечной микробиоты в естественных условиях (*in vivo*) с результатами моделирования в системе *in vitro* на основе ИКС. Установлены ключевые таксономические и функциональные различия между нативной кишечной микробиотой свиней и микробиотой, культивированной в контролируемых условиях.

ИКС апробирована в системе искусственного желудочно-кишечного тракта (иЖКТ). Это позволило оценить динамику микробного сообщества в условиях *in vitro*, смоделировать изменения при воздействии антибиотика и последующей коррекции пробиотическим препаратом на основе *Bacillus subtilis*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования расширяют представления о моделировании микробиоты ЖКТ *in vitro*.

Использование культуральных, молекулярно-генетических и биохимических методов в данной модели обеспечивает комплексную оценку микробных сообществ ЖКТ. Исследование позволяет оценить их состав, численность и динамику при воздействии различных факторов.

С теоретической точки зрения, использование иЖКТ перспективно для промежуточного скринингового этапа. Как альтернатива классическим методам *in vivo* данная разработка снижает зависимость от трудоемких и затратных экспериментов на животных, решает этическую проблему использования живых животных и обеспечивает стандартные условия эксперимента для повышения воспроизводимости результатов. Исследование вносит вклад в разработку новых экспериментальных *in vitro* платформ для изучения микробиоты.

Полученные результаты обладают высокой практической ценностью для ветеринарии и сельского хозяйства.

В настоящее время первичный скрининг кормовых добавок и биологически активных агентов преимущественно осуществляется с использованием культуральных методов, позволяющих оценивать влияние исследуемого вещества на отдельные штаммы микроорганизмов, а также клеточных моделей кишечного эпителия, применяемых для изучения цитотоксичности, барьерной функции и взаимодействия с патогенами (Шевяков А. Н., Гогина Н. Н., 2023.). При необходимости получения данных о безопасности, эффектах, зависимых от дозировки или механизмах действия дополнительно проводят исследования на лабораторных животных. Вместе с тем указанные модели не воспроизводят в полном объеме процессы пищеварения, ферментации и межмикробные взаимодействия, характерные для ЖКТ свиньи.

Разработка и применение модели иЖКТ свиньи целесообразны прежде всего как этап предварительного скрининга исследуемых агентов. На начальной стадии культуральные методы позволяют оценить антимикробную активность, влияние вещества на рост отдельных представителей микробиоты, а также его потенциальную токсичность или стимулирующее действие (Kim H.Y., Moon J.O., Kim S.W., 2024). Однако изолированные культуры не воспроизводят сложные

межмикробные взаимодействия, процессы переваривания и ферментации, происходящие в кишечнике животного. Использование ИЖКТ на следующем этапе позволяет исследовать влияние отобранных агентов в условиях, приближенных к среде ЖКТ свиньи, оценить изменения состава и метаболической активности микробного сообщества, ферментацию субстратов и образование микробных метаболитов. По результатам такого скрининга для последующих исследований на лабораторных животных и свиньях могут быть отобраны лишь наиболее перспективные, безопасные и биологически активные образцы. ИЖКТ не заменяет *in vivo*-эксперимент, а обеспечивает более обоснованный выбор кандидатов и позволяет сократить объем предварительных исследований на животных.

Вследствие этого оценка эффективности кормовых добавок, предназначенных для воздействия на организм животного, во многих случаях требует непосредственного проведения *in vivo*-исследований на свиньях. Такие опыты обеспечивают получение окончательных данных о переносимости добавки, ее влиянии на состояние здоровья животных, показатели роста, конверсию корма, переваримость питательных веществ и состав кишечной микробиоты, однако отличаются значительной продолжительностью, стоимостью и зависимостью результатов от индивидуальных и технологических факторов. Следовательно, актуальной задачей является развитие промежуточных скрининговых подходов, которые позволят обоснованно отбирать наиболее перспективные агенты до проведения экспериментов на целевом виде.

Методология и методы исследования. Методологическая основа исследования заключалась в разработке и апробации искусственной кишечной среды для *in vitro*-моделирования кишечной микробиоты свиней. Использовался комплексный подход, включавший разработку вариаций искусственной кишечной среды для тонкого и толстого отдела ЖКТ, оценку их физико-химических и реологических свойств, культивирование фекальной микробиоты свиней в динамической модели искусственного желудочно-кишечного тракта.

Исследование проводилось с использованием специализированного лабораторного и аналитического оборудования. Применяли физико-химические,

реологические, микробиологические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Функциональная достаточность разработанной *in vitro*-модели кишечной среды свиней обеспечивается заданным диапазоном pH 6,5–7,2, вязкостью 10^2 – 10^3 мПа×с, ферментативной активностью и набором структурных полисахаридных субстратов. Соблюдение комплекса этих параметров позволяет сохранять жизнеспособность и таксономическую структуру кишечной микробиоты в течение не менее 21 суток культивирования.

2. Модульная организация искусственной кишечной среды на едином базовом составе с введением отделоспецифичных компонентов позволяет в рамках одного эксперимента воспроизводить контролируемые физико-химические и реологические условия тонкого (pH $7,0 \pm 0,1$, вязкость $408,9 \pm 155,4$ мПа×с) и толстого (pH $6,7 \pm 0,1$, вязкость $527,4 \pm 266,4$ мПа×с) отделов кишечника свиней, что отличает разработанную среду от существующих аналогов, ориентированных на отдельный отдел ЖКТ или возрастную группу животных.

3. Культивирование фекальной микробиоты свиней в динамической системе имитации ЖКТ с использованием разработанной среды обеспечивает формирование стабильного микробного сообщества (на 7–8-е сутки), таксономически и количественно сопоставимого с нативной микробиотой свиней по ключевым группам микроорганизмов (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Bacteroides spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Enterococcus spp.*), что подтверждает пригодность модели для этапа предварительного скрининга.

4. Разработанная модель воспроизводит амоксициллин-индуцированный дисбиоз кишечного микробиоценоза свиней (снижение общего микробного числа и облигатной микрофлоры на 2–3 порядка к 7–8-м суткам) и позволяет оценивать эффективность его коррекции пробиотическим препаратом на основе *Bacillus subtilis*, демонстрирующим опережающее восстановление *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* при неполной нормализации условно-патогенной флоры. Это подтверждает применимость искусственной кишечной среды как инструмента

сравнительной оценки антибактериальных и пробиотических препаратов до испытаний на целевом виде животных.

Степень достоверности и апробация научных результатов.

Достоверность обеспечена использованием экспериментально апробированной модели искусственного ЖКТ с автоматической регуляцией pH, контролируемые потоками среды и воспроизведением физиологических условий ферментации. Все этапы выполнялись асептически с применением сертифицированного оборудования и стандартизированных протоколов.

Микробиологический анализ включал классические бактериологические методы с идентификацией методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и определением антибиотикочувствительности по CLSI. Количественный анализ микробиоты проводили методом ПЦР в реальном времени.

Статистическую обработку выполняли с использованием описательной статистики: данные представляли как медиану и межквартильный интервал или среднее $\pm$ стандартное отклонение. Для дифференциального анализа таксонов применяли контроль множественных сравнений (FDR, $q < 0,05$).

Данные нашего исследования были представлены на следующих конференциях: «Достижения ученых в реализации научных исследований в агропромышленном комплексе» (Краснодар, 2025), «Генетические технологии в биомедицине» (Москва, 2025), «Агропоколение: наука, практика, инновации» (Краснодар, 2025), «Инновационные технологии в науке и образовании» (Ростов-на-Дону, 2025), а также на Всероссийской научной школе «Медицина молодая» (Москва, 2024) и Международном форуме «Молодежь в АПК» (2025, Ростов-на-Дону).

Результаты научных исследований Ярушниковой Ю.А. внедрены в деятельность Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» (ФГБНУ «ВНИВИПФиТ») и в практику ФБНУ «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, а также в образовательный процесс кафедры

«Биология и общая патология» ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет».

Грантовая поддержка. Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки РФ «Молекулярные механизмы взаимодействия сообществ кишечных микроорганизмов *in vivo* и *in vitro* на базе автоматизированной системы имитации ЖКТ свиньи» (№ НИОКТР 124111200008-4).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 6 из них в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, 1 - в журнале, индексируемый в наукометрической базе данных Scopus.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является результатом исследований, проведенных лично соискателем совместно с коллегами в период с 2023 по 2026 гг. в г. Ростов-на-Дону. Вклад соискателя оценивается не менее 80 %. Участие соавторов отражено в совместных публикациях, соавторы не возражают против использования полученных результатов в диссертационной работе. Лично соискателем обоснована концепция моделирования кишечной микробиоты *in vitro* и разработан состав ИКС, адаптированной для функционирования в автоматизированной системе имитации ЖКТ. Соискатель участвовал в постановках эксперимента, отборе биологического материала, подготовке и инокуляции проб, молекулярно-генетические исследования, включая экстракцию ДНК, постановку и анализ ПЦР в режиме реального времени для оценки состава кишечной микробиоты, а также обработку и интерпретацию полученных данных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология: пункты 3, 4, и 11.

Структура и объем работы. Работа изложена на 160 страницах компьютерного текста и состоит из: введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, списка сокращений, приложений, библиографического списка литературы. Работа

содержит 14 таблиц и 11 рисунков. Библиографический список представлен в виде 154 источников, из них 119 иностранных.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю – доктору биологических наук, профессору Ермакову Алексею Михайловичу (ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет») за всестороннюю научную поддержку, внимательное руководство и ценные рекомендации, оказанные на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Отдельную признательность автор выражает доктору фармацевтических наук, профессору, заведующему кафедрой "Биотехнические и медицинские системы и технологии" Шебеко Сергею Константиновичу (ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет») и доктору ветеринарных наук, заведующему кафедрой "Биология и общая патология" Тресницкому Сергею Николаевичу (ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет») за оказанную помощь в организации исследований и конструктивные замечания.

Автор также выражает благодарность Попову Игорю Витальевичу, Седовой Дарье Андреевне, Головину Сергею Николаевичу и Ханукаеву Максиму Михайловичу (ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет») за оказанное содействие и помощь при проведении экспериментов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности строения ЖКТ свиней

Пищеварительная система свиней выполняет важнейшую функцию обеспечения организма питательными веществами за счет переваривания корма и всасывания продуктов гидролиза, а также выведения неусвоенных остатков пищи и продуктов метаболизма. ЖКТ представляет собой полую трубку, разделенную на функционально специализированные отделы, обеспечивающие последовательное перемещение пищевого комка и его максимальное усвоение (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025; Пузырников А. В., 2020).

Пищеварительный тракт свиней включает следующие анатомические структуры: ротовая полость, ротоглотка, слюнные железы, пищевод, желудок, отделы тонкой кишки (двенадцатиперстная, тощая, подвздошная кишка), печень с желчевыводящими путями и желчным пузырем, поджелудочная железа с панкреатическим протоком, отделы толстой кишки (слепая, ободочная, прямая кишка), завершающиеся анальным отверстием (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025 ; Пузырников А. В., 2020).

1.1.1. Желудок

Желудок свиньи представляет собой однокамерный мешкообразный орган пищеводно-кишечного типа, расположенный в левом подреберье и прилежащий к печени и левому куполу диафрагмы (Пузырников А. В., 2020). Отличительной морфологической особенностью желудка свиней является увеличенная кардиальная часть, в области которой формируется слепой мешок - дивертикул. В желудке свиней выделяют безжелезистую зону в области дивертикула и три типа желез: кардиальные железы, расположенные вдоль большой кривизны и состоящие преимущественно из слизистых клеток. Фундальные железы, продуцирующие кислый секрет и основные пищеварительные ферменты (пепсиноген, реннин, липазу), пилорические железы, образованные преимущественно слизистыми

клетками (Полянская А. И, 2023). Физиологической особенностью желудочного пищеварения у свиней является незначительное перемешивание пищевых масс и их послойное расположение, сохраняющееся в течение нескольких часов после приема корма (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

Согласно современным данным, pH содержимого желудка поросят составляет в среднем $3,36 \pm 0,72$, что обеспечивает оптимальные условия для действия пепсина и первичной денатурации белков корма. Сухое вещество химуса в желудке достигает $27,8 \pm 2,4\%$, что значительно выше, чем в последующих отделах пищеварительного тракта (Rotsaert C. et al., 2025).

1.1.2. Тонкий отдел кишечника

Двенадцатиперстная кишка является начальным и наиболее коротким отделом тонкого кишечника, ее длина составляет 40-90 см. На уровне дуоденального сосочка в просвет двенадцатиперстной кишки открываются общий желчный проток и панкреатический проток, обеспечивающие поступление желчи и панкреатического сока (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

В двенадцатиперстной кишке происходит резкое изменение физико-химических параметров химуса: pH возрастает до 6,5-7,0, а содержание сухого вещества снижается до $10,6 \pm 0,7\%$ за счет разведения секретами поджелудочной железы, печени и кишечных желез. Слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки характеризуется наличием кишечных ворсинок и крипт (либеркюновых желез), обеспечивающих значительное увеличение всасывающей поверхности (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

Морфометрические параметры слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки варьируют в зависимости от возраста: у новорожденных поросят высота ворсинок составляет в среднем 350-400 мкм, а к 150-дневному возрасту увеличивается до 500-600 мкм. Соотношение высоты ворсинок к глубине крипт является важным показателем функционального состояния кишечника и составляет в норме 3:1 - 4:1 (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

Последующей частью тонкого кишечника является тощая кишка – наиболее протяженный сегмент длиной до 14 метров, петли которого фиксированы к задней брюшной стенке посредством брыжейки. Дистально тощая кишка продолжается в подвздошную кишку – терминальный сегмент тонкого кишечника длиной порядка 4 метров (Пузырников А. В., 2020).

1.1.3. Поджелудочная железа

Поджелудочная железа представляет собой паренхиматозный орган смешанной секреции, расположенный в петле двенадцатиперстной кишки. Экзокринная часть железы продуцирует панкреатический сок, содержащий ферменты для расщепления всех основных питательных веществ корма: протеазы (трипсин, химотрипсин), липазы и амилазу (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

Активность липазы у свиней в содержимом подвздошной кишки составляет около 27 единиц/г. Активность химотрипсина и амилазы изменяется в процессе постнатального развития, достигая максимальных значений к моменту отъема. Эндокринная часть поджелудочной железы представлена островками Лангерганса, продуцирующими инсулин и глюкагон, регулирующие углеводный обмен (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

1.1.4. Печень

Печень свиней является крупным паренхиматозным органом (до 2-2,5% от массы тела) и подразделяется на доли: левую латеральную и медиальную, квадратную, правую медиальную и латеральную, хвостатую долю с хвостатым отростком (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

Кровоснабжение печени осуществляется по двум системам: печеночная артерия обеспечивает оксигенированной кровью паренхиму органа, а воротная вена доставляет кровь, обогащенную питательными веществами из желудочно-

кишечного тракта. В печени осуществляется фильтрация крови, метаболизм углеводов, липидов и азотистых соединений, детоксикация продуктов обмена (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

Гепатоциты печени организованы в дольки, в центре которых проходит центральная вена, а по периферии располагаются печеночные триады, включающие междольковую артерию, междольковую вену и междольковый желчный проток. В печени синтезируется желчь, которая накапливается в желчном пузыре и по желчному протоку поступает в двенадцатиперстную кишку, где эмульгирует жиры и активирует панкреатическую липазу. Токсические вещества, поступающие с кровотоком в печень, подвергаются детоксикации в гепатоцитах (Barnett D. R., Bhattacharjya R., Bhattacharjya S., 2025).

1.1.5. Толстый отдел кишечника

Толстый отдел кишечника включает следующие анатомические структуры: слепую, ободочную и прямую кишку, заканчивающуюся анальным каналом и анусом. Несмотря на отсутствие ворсинок на слизистой оболочке толстой кишки, процессы пищеварения в ней продолжают. Толстый отдел кишечника является основным местом локализации наиболее многочисленного и функционально активного микробного сообщества ЖКТ свиньи. В слепой и ободочной кишке создаются анаэробные условия, благоприятные для жизнедеятельности облигатных микроорганизмов и микробной ферментации непереваренных компонентов корма - прежде всего пищевых волокон, крахмала и других сложных углеводов. В этих отделах отмечается более высокое микробное разнообразие по сравнению с тонким кишечником, здесь образуется значительная часть короткоцепочечных жирных кислот, являющихся важными метаболитами микробиоты. В толстом отделе кишечника кишечные железы представлены многочисленными удлинёнными криптами Либеркюна, содержащими большое количество бокаловидных клеток. Они продуцируют преимущественно слизистый секрет, выполняющий защитную и смазывающую функции, участвуют в

поддержании эпителиального барьера, но не являются значимым источником пищеварительных ферментов. (Пузырников А. В., 2020.).

1.2. Особенности микробиоты ЖКТ свиней и ее роль в поддержании функционального состояния организма животного

Кишечная микробиота представляет собой сложную экосистему микроорганизмов, колонизирующих ЖКТ. Согласно имеющимся данным, общее микробное число в дистальных отделах кишечника млекопитающих может достигать 10^{14} КОЕ/г (Turner P.V., 2018). Несмотря на высокую степень вариабельности между особями, микробиота выполняет ряд фундаментальных функций, обеспечивающих поддержание гомеостаза хозяина.

Микробиота кишечника играет незаменимую роль в утилизации компонентов пищи, не поддающихся перевариванию ферментами хозяина, таких как растительные волокна и крахмал (Cotillard A. et al., 2013; Goodman A.L. et al., 2011). Микроорганизмы ферментируют эти компоненты пищи с образованием короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), в частности, бутират, который служит основным источником энергии для клеток слизистой оболочки толстой кишки (Roediger W. E., 1980). Микробиота также задействована в синтезе ряда витаминов и метаболизме желчных кислот, образуя с хозяином интегрированную метаболическую сеть (Kanehisa M., Goto S. ,2000; Swann J.R. et al., 2011 Sedova D. A. et al., 2025).

У поросят концентрация короткоцепочечных жирных кислот в толстом отделе кишечника претерпевает значительные изменения в процессе постнатального развития. К 42-му дню жизни общая концентрация КЦЖК возрастает в 20 раз по сравнению с новорожденными животными, при этом профиль метаболитов существенно изменяется: доля ацетата снижается с 74,5% до 36,5%, тогда как содержание масляной и пропионовой кислот увеличивается (Qi R. et al.,2021).

Метаболическая активность кишечной микробиоты свиней включает не только ферментацию пищевых волокон, но и биотрансформацию аминокислот с образованием биологически активных метаболитов. В содержимом толстого кишечника идентифицированы такие соединения, как гистамин, тирамин, орнитин, ацетил-орнитин, β -гидроксibuтират, цитруллин, лактат и глутамат, концентрация которых коррелирует с численностью специфических бактериальных таксонов (Qi R. et al., 2021).

Нормальная микробиота обеспечивает колонизационную резистентность, препятствуя заселению и размножению в кишечнике патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (Schaedler R.W. et al., 1965).

Характер питания является одним из наиболее мощных факторов, определяющих состав и функциональную активность кишечного микробного сообщества (Тихменева (Ярушникова) Ю.А., Попов И.Г., Ермаков А.М., 2026). Изменения в диете могут приводить к значительным сдвигам в его структуре, что, в свою очередь, ассоциировано с изменением восприимчивости к таким патологическим состояниям, как метаболический синдром (Elinav E. et al., 2011) и воспалительные заболевания кишечника (Cotillard A. et al., 2013; Goodman A.L. et al., 2011).

Помимо общих метаболических и защитных функций, кишечная микробиота демонстрирует устойчивую пространственную структуру и определенный «ядровой» состав, который сохраняется даже при варьировании внешних условий. Исследования показывают, что у млекопитающих существует набор таксонов, встречающийся практически у всех особей и формирующий базовый функциональный каркас сообщества (Alberdi A., Martin Bideguren G., Aizpurua O., 2021). Такой консервативный пул микроорганизмов обеспечивает стабильность ключевых физиологических процессов - ферментации пищевых остатков, синтеза метаболитов и поддержания барьерной функции кишечника (Albertsen M. et al., 2013).

Хотя индивидуальный уровень разнообразия может значительно отличаться, совокупность доминирующих бактериальных филумов остается сравнительно

постоянной. Как правило, в состав микробиоты входят представители Firmicutes, Bacteroidetes, а также в меньшей степени Proteobacteria и Actinobacteria (de Jonge N. et al., 2022). Их соотношение влияет на энергетический баланс, эффективность усвоения питательных веществ и характер образующихся метаболитов. Например, увеличение доли Firmicutes ассоциировано с усилением ферментации сложных углеводов и более интенсивным образованием КЦЖК (de Jonge N. et al., 2022).

У свиней микробиота желудочно-кишечного тракта характеризуется выраженной региональной специфичностью. Согласно результатам метагеномных исследований, доминирующими филумами являются Firmicutes (45,36%) и Bacteroidetes (37,47%), которые в совокупности составляют более 90% всего микробного сообщества кишечника. В подвздошной кишке доля Proteobacteria может достигать 40%, что отражает специфику пристеночной микробиоты тонкого отдела (Yang H. et al., 2018).

На уровне родов микробное сообщество кишечника свиней представлено преимущественно *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Treponema* и *Lactobacillus*, при этом их соотношение варьирует в зависимости от отдела пищеварительного тракта (Yang H. et al., 2018). В желудке отмечается минимальное микробное разнообразие с преобладанием *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, составляющих до 95% сообщества. В тонком кишечнике доминируют *Lactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Romboutsia* и представители семейства *Enterobacteriaceae*. В толстом отделе кишечника и прямой кишке преобладают *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia* и *Ruminococcus* (Kim H. B., Isaacson R. E., 2015).

Микробные сообщества ЖКТ играют важную роль в формировании защиты против инфекций, через взаимодействие сигнальных молекул с эпителиальными клетками (Azad M.A.K. et al., 2018; McKenzie V.J. et al., 2017). Данный механизм лежит в основе устойчивости организма к различным факторам, таким как патогены, изменения в рационе и среде (Zhao Y et al., 2015).

Результаты исследований подтверждают связь между составом кишечной микробиоты, здоровьем животных и реакцией на окружающую среду. Развитие нарушений метаболизма, воспалительных реакций и изменение пищевого

поведения тесно связано с изменением баланса групп бактерий в ЖКТ (de Jonge N. et al., 2022). Поэтому изучение микробиоты служит ключевым объектом для биомедицинских и ветеринарных исследований в области разработки терапии и профилактики заболеваний.

Это подтверждает гипотезу о том, что для воспроизведения микробиоты *in vitro* необходимо моделировать химические, физические и биологические условия реального ЖКТ. Но существующие экспериментальные системы не унифицированы и не обладают согласованными подходами к воспроизведению физиологических условий.

1.3. Методы изучения микробиоты свиней

Исследование кишечной микробиоты свиней требует комплексного подхода с применением различных методов, каждый из которых обладает специфическими преимуществами и ограничениями. Современные подходы к изучению микробиоты включают молекулярно-генетические, микробиологические и биохимические методы, которые дополняют друг друга и позволяют получить полную картину структурно-функциональной организации кишечного микробного сообщества.

1.3.1. Молекулярно-генетические методы

Молекулярно-генетические методы являются основой современных исследований микробиоты, позволяя идентифицировать и количественно оценивать микробные сообщества независимо от возможности их культивирования. Учитывая, что культуральные методы позволяют охватить ограниченную долю микробного разнообразия, молекулярно-генетические подходы открыли принципиально новые возможности для изучения некультивируемых представителей микробиоты (Fu H. et al., 2021).

Секвенирование гена 16S рРНК представляет собой стандартизированный метод профилирования бактериальных сообществ, основанный на амплификации и секвенировании переменных участков (чаще всего V4 региона) гена 16S рРНК. Данный подход позволяет идентифицировать и количественно оценить бактериальный состав микробиоты на уровне рода и вида, а также рассчитать показатели альфа- и бета-разнообразия микробных сообществ (Wei L., Zhou W., Zhu Z., 2022). В исследовании Hu et al. (2024) с использованием 16S рРНК секвенирования было проанализировано 112 образцов фекалий от семи пород свиней, что позволило установить различия в составе бактериальных сообществ между отъемышами и откормочными животными, а также выявить доминирующие роды, такие как *Treponema*, *Phascolarctobacterium*, *Oscillibacter*, *Bacteroides* и *Prevotella*. В этом авторы проанализировали структуру и функции фекального микробиома семи пород свиней и составили расширенный эталонный каталог кишечных микроорганизмов, включающий 17 020 160 генов.

Секвенирование метагенома дает более обширную информацию, позволяя не только изучать таксономический состав, но и оценить функциональный потенциал микробного сообщества на уровне генов. При метагеномном подходе сначала происходит выделение тотальной ДНК, затем производят высокопроизводительное секвенирование. Полученные данные исследуют с помощью биоинформатического анализа с использованием специализированных программ (MetaGeneMark, CD-Hit) для предсказания открытых рамок считывания и аннотации генов (Hu J. et al., 2024).

Проанализировав относительную численность микробов, авторы выявили три основных доминирующих микроба кишечника (*Phascolarctobacterium succinatutens*, *Prevotella copri* и *Oscillibacter valericigenes*). Результаты полного секвенирования генома также показали, что на основе аннотаций генома у трёх основных кишечных микробов можно предсказать наличие нескольких метаболических путей по базе данных Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (таких как метаболизм фенилаланина, витамина B6 и триптофана) и эти результаты согласуются с данными метаболома фекалий. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что три основных кишечных микроба играют

важную роль в поддержании индексов органов хозяина, барьерной функции кишечного эпителия, морфологии слизистой оболочки кишечника и метаболизма питательных веществ (Hu J. et al., 2024).

Также в работе был описан подход на основе реконструкции геномов из метагеномных данных (metagenome-assembled genomes, MAGs). Такой метод позволяет восстановить полные или частичные геномы микробного сообщества без предварительного культивирования. Геном прокариот был реконструирован на основе метагеномных данных с помощью программы metaWRAP (версия 1.1.5). Вкратце, метагеномное биннинг-разделение было выполнено на основе контигов метагеномной сборки и чистых ридов с помощью модуля metaWRAP «binning», который включает в себя три программы для биннинга (CONCOCT, MaxBin2 и metaBAT2). Затем с помощью модуля «bin refinement» были получены метагеномные сборки в каждом образце. Для оценки загрязненности и полноты заполнения контейнеров в соответствии с критериями оценки качества использовалось программное обеспечение CheckM (версия 1.0.12). Контейнеры, заполненные более чем на 50 % и с уровнем загрязнения менее 5 %, были сохранены. В общей сложности было создано 10 738 MAG в 112 метагеномных образцах свиного кишечника. С помощью программного обеспечения dRep (версия 2.5.4) были удалены повторяющиеся MAG со средней нуклеотидной идентичностью (ANI) 90 % по методу Mash для основного кластера и значениями сходства ANI 99 % с перекрытием не менее 30 % для вторичных кластеров каждого основного кластера. Оставшиеся 4910 NR MAG были таксономически классифицированы, а маркерные гены были отобраны с помощью программы GTDB-tk (версия 1.0.2). Для построения филогенетических деревьев использовалась программа FastTree (версия 2.1.10), а для их визуализации — программа iTOL. Путем реконструкции прокариотических геномов на основе метагеномных данных было получено 4910 метагеномно-собранных геномов (MAG) с учетом показателей контроля качества (>50% полноты и <5% загрязнения). Среди 11 418 273 генов кишечной микробиоты NR, идентифицированных в этом исследовании, в общей сложности 9 141 561 ген NR

совпали с MAG, а степень покрытия составила ~80,1%. Три типа принадлежали к археям, а 21 тип — к бактериям. 4877 MAG (99,3% от общего числа MAG) были отнесены к 104 семействам, а 4150 MAG (84,5% от общего числа MAG) — к 269 родам. В общей сложности 621 MAG был отнесен к 180 известным видам, что указывает на потенциал для изучения новых видов кишечной микробиоты у свиней (Hu J. et al., 2024).

Также авторы показали анализ резистома, который позволяет идентифицировать и дать количественную оценку АРГ в микробных сообществах. В ходе исследования у свиней было выявлено в общей сложности 126 генов устойчивости к антибиотикам (АРГ) кишечной микрофлоры. Среди них несколько генов устойчивости к антибиотикам (таких как *tetQ*, *tetW*, *bacA*, *aph3iiiA*, *tet40*, *ermF* и *mefA*) преобладали в микробиоме кишечника свиней. Причем коммерческие породы свиней, такие как Дюрок, Ландрас и Йоркшир показывали более высокую представленность АРГ, по сравнению с местными китайскими свиньями. Анализ методом Спирмена показал, что *Escherichia coli* значительно коррелирует с несколькими генами устойчивости к антибиотикам, включая *tetA*, *tetB*, *tetC*, *acrB*, *mdtF*, *acrA*, *macB*, *arnA*, *emrD*, *cml_E1*, *bll_EC*, *bcR*, *mdtH*, *ksgA*, *mdtN*, *mdtO*, *mdfA*, *mdtL*, *mdtG*, *mdtP*, *mdtE*, *mdtK*, *qnrS*, *mdtM* и *tolC* (Hu J. et al., 2024).

Эти данные позволяют сделать вывод о том, что молекулярно-генетические методы могут глубоко анализировать микробиоту, но для полноценного понимания взаимодействия микробиоты с организмом хозяина требуется дополнение микробиологическими и биохимическими исследованиями. Так мы сможем оценить не только генетический потенциал, но метаболическую активность микробиоты.

Эффективность применения молекулярно-генетических методов в изучении микробиоты свиней была продемонстрирована в исследовании связи между кишечным микробиомом и эффективностью использования корма (ЭИК). При дополнении секвенирования 16S рРНК метагеномным анализом были выявлены таксоны и их функциональные пути, которые связаны с ОПК. В исследовании 208 здоровых свиней породы дюрок секвенирование региона V3-V4 гена 16S рРНК с

использованием консервативных праймеров 338F и 806R на платформе MiSeq (Illumina) позволило идентифицировать в среднем 872 операционные таксономические единицы (OTU) на образец после контроля качества и кластеризации на основе 97% идентичности последовательностей (Jiang H. et al., 2021).

Для повышения разрешающей способности таксономической идентификации и выявления функциональных различий был применен метагеномный анализ образцов с экстремальными значениями остаточного потребления корма (ОПК) (по 4 образца с высоким и низким ОПК). Метагеномное секвенирование на платформе HiSeq2500 (Illumina) с последующей биоинформатической обработкой, включающей удаление низкокачественных ридов (содержащих >10% неопределенных оснований или Q<20) и ридов, выравнивающихся с геномом свиньи (*Sus scrofa* 11.1), позволило получить в среднем 3,2 миллиона контигов со средним размером 1233 п.н. и N50 длиной 1406 п.н.. Сборка высококачественных ридов осуществлялась с использованием SOAPdenovo2 с последующим объединением контигов в более длинные последовательности с помощью программы Rabbit (Jiang H. et al., 2021).

Результаты метагеномного анализа выявили 4442 бактериальных вида в 8 образцах, что значительно превышает разрешающую способность секвенирования гена 16S рРНК и демонстрирует улучшенное филогенетическое разрешение на уровнях рода и вида. Сравнительный анализ с использованием LEfSe (linear discriminant analysis effect size) идентифицировал 18 видов, обогащенных у свиней с низким ОПК (высокая ЭИК), среди которых 9 видов принадлежали к порядку *Clostridiales*, включая *Lachnospiraceae bacterium* 28-4, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Roseburia inulinivorans* и *Ruminococcus flavefaciens*. В противоположность этому, 16 видов с повышенной представленностью у свиней с высоким ОПК (низкая ЭИК) включали 6 представителей семейства *Prevotellaceae*, в первую очередь *Prevotella copri*, *Prevotella multisaccharivorax* и *Prevotella timonensis* (Jiang H. et al., 2021).

Функциональный анализ метагеномных данных с использованием базы данных KEGG выявил существенные различия в метаболическом потенциале

кишечной микробиоты в зависимости от эффективности использования корма. Микробиота свиней с низким ОПК характеризовалась высокой представленностью генов, ассоциированных с метаболизмом и биосинтезом аминокислот (аминоацил-тРНК биосинтез, биосинтез лизина, метаболизм фенилаланина), метаболизмом жирных кислот и двухкомпонентными системами. Напротив, у свиней с высоким ОПК отмечалась повышенная представленность генов, связанных с метаболизмом моносахаридов (метаболизм фруктозы и маннозы, метаболизм галактозы, взаимопревращения пентоз и глюкуронов), биосинтезом липополисахаридов, деградацией других гликанов, антимикробной резистентностью (СAMP-резистентность, β -лактазная резистентность) и окислительным фосфорилированием (Jiang H. et al., 2021; Sedova D. A. et al., 2025).

Методы метагеномного и 16S рРНК секвенирования позволяют проанализировать как таксономический состав, так и генетический потенциал. Однако молекулярно-генетические методы предоставляют информацию о генетическом составе микробного сообщества, не отражая реальную экспрессию генов и метаболическую активность в физиологических условиях. В связи с этим для полноценного понимания функционального состояния микробиоты и ее влияния на физиологию хозяина критически важно дополнение молекулярно-генетических данных микробиологическими методами культивирования и биохимическими методами анализа метаболитов, которые непосредственно отражают реальную метаболическую активность микробного сообщества.

1.3.2. Культуральные методы

Микробиологические методы культивирования, несмотря на развитие молекулярно-генетических технологий, сохраняют принципиальное значение для изучения кишечной микробиоты свиней, поскольку обеспечивают получение живых культур микроорганизмов, необходимых для детальной фенотипической характеристики, изучения механизмов взаимодействия с хозяином и разработки пробиотических препаратов. Подход культуральных методов – систематическое

культивирование микроорганизмов с использованием множества питательных сред и условий инкубации – позволяет выявить микробные популяции, не детектируемые методами метагеномики, и создать коллекции живых культур для последующих исследований (Lagier J.C. et al., 2018).

Микробиологический анализ кишечной микробиоты свиней включает несколько этапов: отбор образцов фекалий в стерильные емкости с немедленным помещением в анаэробные условия (с использованием систем GasPak EZ anaerobe pouch system), транспортировку в анаэробную камеру, гомогенизацию образцов, приготовление серийных десятикратных разведений в стерильном 0,9% растворе NaCl и высев на различные питательные среды (Пузырников А.В., 2020). Все процедуры культивирования облигатных анаэробов должны проводиться в анаэробных камерах (например, COY Laboratories) для предотвращения контакта с кислородом, летального для большинства представителей кишечной микробиоты (Mun D. et al. 2021).

Для максимального охвата разнообразия микробиоты применяют комбинацию селективных и неселективных питательных сред. Неселективные среды обеспечивают рост широкого спектра микроорганизмов. Селективные среды предназначены для целенаправленного выделения специфических таксономических групп. Например, агар де Мана-Рогозы-Шарпа (MRS – de Man Rogosa Sharpe agar) для лактобацилл и селективный агар для бифидобактерий (BS – Bifidobacterium selective agar) (Mun D. et al. 2021).

В исследовании кишечной микробиоты свиноматок и отъемышей с использованием четырех коммерчески доступных сред (PEA, FAS, MRS, BS) было получено 278 колоний от свиноматок и 149 колоний от отъемышей. Сравнительный анализ эффективности различных сред показал, что из фекалий свиноматок на среде PEA было идентифицировано 16 видов бактерий, на FAS – 10 видов, на MRS – 6 видов, на BS – 3 вида, при этом процентное соотношение общего числа изолированных колоний составило 29,86%, 28,42%, 19,42% и 22,3% соответственно. Для образцов от отъемышей распределение было следующим: PEA – 6 видов (29,53%), FAS – 8 видов (27,52%), MRS – 7 видов (23,49%), BS – 5

видов (19,46%). Эти данные демонстрируют, что различные питательные среды обеспечивают выделение разных спектров микроорганизмов, что обосновывает необходимость применения комплекса сред для максимального охвата культивируемого разнообразия (Mun D. et al. 2021).

Условия культивирования имеют критическое значение для успешной изоляции представителей кишечной микробиоты. Посевы инкубируют в анаэробной камере при температуре 37°C в течение 48 часов, после чего производят отбор отдельных колоний для последующего субкультивирования. Для получения чистых культур необходимо минимум три последовательных пересева в соответствующих условиях культивирования. Изолированные бактерии хранят при температуре –80°C в криопробирках, содержащих 250 мкл 50% глицерина и 750 мкл бактериальной культуры (Mun D. et al. 2021).

Сравнительный анализ микробиологических данных и данных метагеномного анализа выявил принципиальную комплементарность этих подходов. Всего было идентифицировано 206 бактериальных видов и 2 вида архей при комбинированном использовании культурозависимых и культуронезависимых методов. Из 23 бактериальных видов, выделенных культуральным методом, 15 видов (65%) не были детектированы методом метагеномного анализа (Mun D. et al., 2021).

Среди эксклюзивно культивируемых бактерий были представители родов *Bacillus*, *Aerococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia* и *Lactobacillus* (Mun D. et al., 2021).

Важным результатом микробиологического анализа является обнаружение новых таксонов: в образцах фекалий свиноматок было идентифицировано 1 новый род и 15 новых бактериальных видов (с сходством последовательностей <98,7%), в образцах отъемышей – 3 новых вида (Mun D. et al., 2021).

Интересно отметить, что из 10 родов, доминирующих по данным метагеномного анализа (*Treponema*, *Prevotella*, *Christensenella*, *Muribaculum*, *Turicibacter* и др.), культуральным методом был выделен только род *Lactobacillus*.

Кроме того, большинство родов, выделенных с помощью культуральных методов, представлены в большем количестве, чем те, которые были идентифицированы с помощью метагеномики. Этот результат говорит о том, что для полного понимания микробиоты кишечника необходима правильная интеграция метагеномики культурального метода (Mun D. et al., 2021).

Хотя культуральные методы не позволяют с первого взгляда оценить состав всего микробного сообщества, они позволили подтвердить существование кишечных микробных популяций, которые невозможно идентифицировать с помощью метагеномики. Кроме того, выделяя живые бактерии закладывается основа для подтверждения типов взаимодействия и механизмов действия кишечных микробов на организм хозяина (Mun D. et al., 2021). Оптимальная стратегия исследования микробиоты предполагает интеграцию культуральных методов с метагеномикой и анализом метаболитов для получения полной картины структурно-функциональной организации микробного сообщества.

1.3.3. Биохимические методы анализа метаболитов микробиоты

Биохимические методы анализа метаболитов кишечной микробиоты представляют собой критически важное дополнение к молекулярно-генетическим и культуральным подходам, поскольку позволяют оценить реальную функциональную активность микробного сообщества и его влияние на физиологию организма-хозяина. В то время как метагеномика выявляет генетический потенциал микробиоты, а культуральный метод обеспечивает доступ к живым культурам, метаболомика непосредственно измеряет низкомолекулярные продукты микробного метаболизма, которые служат медиаторами взаимодействия микробиота-хозяин (Vasquez R. et al., 2022).

Кишечная микробиота свиней продуцирует широкий спектр биологически активных соединений, включая КЦЖК, вторичные желчные кислоты, полиамины, индольные соединения, фенольные метаболиты, нейротрансмиттеры и витамины. В обзорной работе Vasquez R. et al (2022), систематизированы данные о

биологической активности основных классов метаболитов, продуцируемых кишечной микробиотой свиней. Метаболиты, вырабатываемые микробиомом кишечника, такие как короткоцепочечные жирные кислоты, среднецепочечные жирные кислоты, вторичные желчные кислоты, полиамины, индольные и фенольные соединения, а также различные нейромедиаторы, играют важнейшую роль в поддержании и улучшении здоровья свиней. В обзоре описаны механизмы продукции КЦЖК (уксусная, пропионовая, масляная). Образование метаболитов происходит в результате микробной ферментации пищевых волокон и синтеза полиаминов (путресцин, спермидин, спермин). Также образуются индольные метаболиты (индол, индол-3-уксусная кислота, индол-3-пропионовая кислота) из триптофана. КЦЖК обеспечивают энергией организм свиней, регулируют функции кишечного барьера и влияют на моторику кишечника.

В исследовании López-Bascón M. A. et al. (2019), авторы для изучения метаболома использовали методы жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC–MS/MS) и газовой хроматографии с масс-спектрометрией (GC–MS). Они исследовали 6 видов экстрагентов для выделения метаболитов из фекальных образцов свиней. В общей сложности с помощью комбинации всех экстрагентов и аналитических платформ было предварительно идентифицировано 303 соединения, основными семействами которых являются аминокислоты, жирные кислоты и их производные, углеводы и карбоновые кислоты. Авторы описывают важность стандартизации протоколов пробоподготовки для обеспечения воспроизводимости результатов.

В исследовании Wang J. et al. (2025) изучалась ось микробиота-метаболиты при всасывании КЦЖК у свиней породы Хуайнань. Авторы использовали комплекс методов: секвенирование 16S рРНК на платформе Illumina MiSeq, метаболомика методом UPLC-Q-Exactive-MS и транскриптомный анализ. Профилирование микробиоты показало, что свиньи с высокой плотностью микробиоты обладают значительно большим микробным разнообразием и стабильностью состава, особенно в прямой кишке. Среди 2620 идентифицированных видов *Lactobacillus johnsonii* и *Lactobacillus amylovorus* были

широко распространены у свиней с высокой плотностью микробиоты. Эти виды, продуцирующие КЦЖК, хорошо известны своей способностью вырабатывать ацетат, пропионат и бутират.

Интегративный анализ выявил значимые корреляции между относительным обилием определенных бактериальных таксонов, концентрациями специфических метаболитов и уровнями экспрессии генов, регулирующих биосинтез жирных кислот (FASN, ACC), окисление жирных кислот (CPT1A) и транспорт липидов (FABP2, CD36). Обогащение анализа метаболических путей по базе KEGG показало активацию путей биосинтеза ненасыщенных жирных кислот, метаболизма глицерофосфолипидов и метаболизма аминокислот. Авторы заключают, что микробиота тощей кишки и ее метаболиты играют критическую роль в регуляции экспрессии генов энтероцитов, контролирующих всасывание и метаболизм жирных кислот. Ось микробиота-метаболиты, обогащенная лактобактериями, которые участвуют в ферментации, трансформации желчных кислот и выработке противовоспалительных метаболитов, лежит в основе превосходной эффективности усвоения жирных кислот и накопления внутримышечного жира (Wang J. et al., 2025)

Интегративный анализ микробиоты и метаболома различных отделов желудочно-кишечного тракта с одновременной оценкой системного метаболома позволяет установить пространственную специфичность микробиота-метаболитных взаимодействий (Liu Q. et al. 2023). В работе Liu Q. et al. (2023), исследователи провели обширное профилирование связей между микробиотой различных отделов кишечника и сывороточным метаболомом у 190 коммерческих свиней породы Дюрок. Для этого были собраны образцы содержимого из пяти анатомически различных локализаций: двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки, слепой кишки и ободочной кишки. Секвенирование региона V3-V4 гена 16S рРНК проводили на платформе Illumina HiSeq для характеристики пространственного распределения бактериальных таксонов. Нецелевой метаболомный анализ сыворотки крови выполняли методом UPLC-QTOF-MS в режимах положительной и отрицательной ионизации с последующей аннотацией

метаболитов по базе данных HMDB. Всего было идентифицировано 1247 сывороточных метаболитов. Корреляционный анализ методом Спирмена между относительным обилием 342 бактериальных родов и концентрациями сывороточных метаболитов выявил 15 632 значимые корреляции ($p < 0,05$,). Результаты продемонстрировали, что метаболиты сыворотки демонстрировали локализационно-специфичные ассоциации с микробиотой. Например, метаболиты, связанные с метаболизмом желчных кислот и липидов, наиболее сильно коррелировали с микробиотой двенадцатиперстной и тощей кишки, тогда как метаболиты аминокислот и КЦЖК с микробиотой слепой и ободочной кишки. Анализ ассоциаций с фенотипическими признаками показал, что специфические комбинации микробных таксонов и их метаболитов в подвздошной и слепой кишке значимо коррелировали с толщиной шпика и процентом постного мяса в туше. Авторы заключают, что системный метаболом является интегральным отражением метаболической активности микробиоты различных отделов кишечника, и пространственно-специфичное профилирование микробиоты необходимо для понимания ее вклада в метаболизм хозяина.

1.4. Роль микробиоты в развитии кишечных инфекций у свиней.

Кишечная микробиота свиней представляет собой сложную и динамичную экосистему, участвующую в переваривании нутриентов, продукции метаболитов, формировании колонизационной резистентности и регуляции местного и системного иммунного ответа. В норме это сообщество поддерживает барьерную функцию кишечника и ограничивает колонизацию патогенными микроорганизмами, тогда как при нарушении его структуры и метаболической активности развивается дисбиоз, повышающий восприимчивость животных к инфекциям. В последние годы накоплены данные о том, что при вирусных, бактериальных и стресс-ассоциированных состояниях у свиней изменения микробиоты выступают не только следствием болезни, но и одним из факторов ее прогрессирования (Liu Y. et al., 2025).

1.4.1. Вирус эпидемической диареи свиней

Кишечная микробиота свиней играет критическую роль в поддержании физиологических, метаболических и иммунных функций хозяина, формируя стабильные симбиотические отношения и выступая первой линией защиты против патогенов, включая вирусные. Нарушения этого баланса могут приводить к развитию или усугублению различных заболеваний, в том числе вызванных энтерическими коронавирусами свиней (ЭКС), среди которых вирус эпидемической диареи свиней (ВЭДС) занимает особое место как один из наиболее изученных в контексте взаимодействий с микробиотой.

В работе Koh и соавт. (2015) было показано, что ВЭДС-инфекция сопровождается значительными изменениями микробного сообщества толстого кишечника, причем различия между здоровыми и инфицированными животными выявляются как на уровне типов, так и на уровне родов. Анализ индексов разнообразия (OTUs, Shannon, Chao, Simpson) продемонстрировал, что микробное разнообразие кишечника у здоровых поросят было выше, чем у инфицированных ($p < 0.05$). Авторы выдвинули гипотезу, что диарея, вызванная ВЭДС-инфекцией, может физически удалять или «вымывать» большинство микроорганизмов из кишечника хозяина, а дисбиоз, индуцированный ВЭДС, делает животных уязвимыми к воздействию различных патогенных агентов.

На уровне типов у здоровых поросят доминировали *Firmicutes* (около 57% от общего числа прочтений), за которыми следовали *Proteobacteria* (25,1%), *Bacteroidetes* (10,4%), неклассифицированные бактерии (3,7%), *Actinobacteria* (3,2%) и *Spirochaetes* (0,9%). В инфицированной группе доминирующим типом стали *Fusobacteria* (около 32%), тогда как в норме их доля составляла лишь 0,1%. На уровне родов в здоровой группе наиболее представленными были *Psychrobacter* (45,3%) и *Lactobacillus* (25,8%), а также *Prevotella*, *Carnobacterium*, *Faecalibacterium*, *Sporosarcina*, *Paenibacillus* и *Clostridium*. Напротив, в группе инфицированных преобладала филум *Fusobacteria* (приблизительно 32%). За исключением родов *Psychrobacter* и *Carnobacterium*, численность родов *Fusobacterium*, *Escherichia*

(*Shigella*), *Prevotella* и *Faecalibacterium* значительно различалась ($P < 0,05$) между нормальной и инфицированной группами. Численность патогенных организмов, включая *Fusobacterium* и *Escherichia* (*Shigella*), была заметно увеличена в инфицированной группе, в то время как численность большинства комменсальных бактерий (т.е. *Psychrobacter*, *Prevotella* и *Faecalibacterium*), наблюдаемых в здоровом желудочно-кишечном тракте, снизилась. Это может иметь серьезные последствия, поскольку предполагается, что эти комменсальные бактерии играют важную роль. Например, в качестве активных пищеварительных ферментов и/или бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты (Koh et al., 2015).

В работе Liu et al. (2025) авторы выяснили, что энтерические коронавирусы свиней могут изменять состав бактериального сообщества. ВЭДС значительно изменяет микробиоту кишечника инфицированных поросят, что приводит к заметному увеличению количества бактерий *Firmicutes* в кишечном тракте. Пять типов составляют $> 90\%$ от общей популяции бактерий в микробиоте поросят, инфицированных ВЭДС: *Firmicutes* (56,4%), *Proteobacteria* (16,0%), *Bacteroidetes* (13,9%), *Fusobacteria* (10,8%) и *Actinobacteria* (2,9%). На уровне рода лактобациллы постоянно присутствуют в избытке в тонком кишечнике инфицированных поросят в возрасте 1-4 недель, достигая максимума в первые несколько недель. Однако его количество значительно уменьшается к третьей неделе заражения. *Escherichia-Shigella* присутствует во всех возрастных группах, но ее количество также снижается у поросят, зараженных в возрасте 3 недель.

По сравнению со здоровыми поросятами, микробиота кишечника поросят, инфицированных ВЭДС, претерпевает возрастные изменения, особенно в популяциях *Lactobacillus* и *Escherichia-Shigella*. В тонком кишечнике поросят, инфицированных в возрасте 1 недели, количество *Firmicutes* увеличивается, в то время как протеобактерий и бактериодет уменьшается. Интересно, что у инфицированных поросят в возрасте 2 недель наблюдается обратная тенденция: количество *Bacteroidetes* увеличивается в двенадцатиперстной и тощей кишке. У инфицированных поросят в возрасте 4 недель количество *Firmicutes* и *Proteobacteria* остается стабильным, в то время как количество *Bacteroidetes* значительно

увеличивается. На уровне родов *Lactobacillus*, *Veillonella* и *Enterococcus* значительно увеличиваются у однонедельных инфицированных поросят, тогда как *Escherichia-Shigella* и *Bacteroides* снижаются. У двухнедельных инфицированных поросят возрастает численность *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus* и *Klebsiella*, а *Lactobacillus* снижается. К четверем неделям доминируют *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*, с заметным снижением *Lactobacillus* и *Akkermansia* (Liu et al.,2025).

Показано, что *Lactobacillus* обогащен в кишечнике здоровых поросят, но снижается у животных с диареей. Эта динамика, особенно увеличение *Escherichia-Shigella* и снижение *Lactobacillus* и *Enterococcus*, отражает тяжесть ВЭДС-инфекции, причем более молодые поросята демонстрируют большее микробное разнообразие в двенадцатиперстной и тощей кишке по сравнению с другими отделами кишечника (Liu et al.,2025).

Накопленные данные показывают, что ВЭДС-инфекция вызывает глубокие нарушения как структуры микробиоты, так и метаболического гомеостаза кишечника поросят, причем тяжесть этих изменений зависит от возраста животных, отдела кишечника и генетического фона. Дисбиоз при эпидемической диарее свиней следует рассматривать как важное звено патогенеза, которое усиливает поражение кишечника и может затруднять восстановление после инфекции.

1.4.2. Африканская чума свиней

Не менее показательные изменения микробиоты описаны при африканской чуме свиней (АЧС). В исследовании, посвященном свиньям, экспериментально инфицированным высоковирулентным штаммом АЧС генотипа II, установлено, что течение болезни сопровождается динамическими изменениями кишечного микробиома. Образцы фекалий собирали ежедневно и распределяли на четыре фазы инфекции (до заражения, первичная фаза, клиническая фаза и терминальная фаза) на основании клинических признаков животных. Индексы богатства микробиоты (ACE и Chao1) значительно снижались в терминальной фазе АЧС-инфекции ($p < 0,05$), тогда как индексы разнообразия (NPShannon и Shannon)

значительно возрастали в клинической фазе, а индекс Simpson значительно снижался (Ko Y.S. et al., 2023).

На уровне типов основные изменения микробиоты были связаны со значимым, постепенным увеличением *Proteobacteria* и снижением *Actinobacteria* в течение АЧС-инфекции (FDR < 0,001). Относительная представленность *Tenericutes* значительно снижалась, тогда как *Spirochaetes* возрастала в клинической и терминальной фазах (FDR < 0,05). На уровне семейств наблюдалось значимое увеличение *Bacteroidaceae* и *Succinivibrionaceae* и снижение *Lactobacillaceae*, PAC001057_f (Mollicutes) и *Coriobacteriaceae* в течение АЧС-инфекции (FDR < 0,05) (Ko Y.S. et al., 2023).

Относительная представленность бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты, включая представителей *Ruminococcaceae*, *Roseburia* и *Blautia*, значительно снижалась в течение АЧС-инфекции. В семействе *Ruminococcaceae*, которое оставалось доминирующим во всех фазах инфекции, относительная представленность прогрессивно снижалась, при этом девять родов значительно уменьшались (FDR < 0,05), среди которых наиболее выраженные изменения касались *Eubacterium_g23*. В семействе *Lachnospiraceae*, втором по численности в составе *Firmicutes*, род *Blautia* также значительно снижался в течение АЧС-инфекции. Кроме того, *Collinsella aerofaciens group* – уникальная бутират-продуцирующая бактерия в типе *Actinobacteria* – также демонстрировала значимое снижение при АЧС.

Снижение КЦЖК-продуцирующих бактерий при АЧС-инфекции имеет принципиальное значение, поскольку короткоцепочечные жирные кислоты, особенно бутират, участвуют в поддержании целостности эпителиального барьера, энергетическом обеспечении колоноцитов и противовоспалительной регуляции через G-белок-сопряженные рецепторы (GPCR) и ингибирование активации NF-κB. Бутират также модулирует дифференцировку Т-клеток в эффекторные клетки (Th1 и Th17) и регуляторные Т-клетки (Treg), продуцирующие IL-10, проявляя противовоспалительные свойства. Дефицит КЦЖК может способствовать

усилению барьерной дисфункции, воспаления и вторичных нарушений в кишечнике на фоне системной вирусной инфекции (Ko Y.S. et al., 2023).

Прогнозируемый функциональный анализ с использованием PICRUST выявил значимое снижение представленности 15 иммуно-связанных метаболических путей у АЧС-инфицированных свиней по сравнению со здоровыми животными, включая гемопоэтическую клеточную линию, дифференцировку Th17-клеток, дифференцировку Th1 и Th2-клеток, сигнальные пути Toll-подобных рецепторов, Т-клеточных рецепторов, В-клеточных рецепторов, NOD-подобных рецепторов, сигнальный путь IL-17, кишечную иммунную сеть для продукции IgA и другие ($FDR < 0,05$). Это указывает на то, что АЧС модифицирует кишечную микробиоту таким образом, что это может быть ассоциировано со статусом иммуносупрессии хозяина (Ko Y.S. et al., 2023; Sedova D. A. et al., 2025).

1.4.3. Дисбиоз при отъеме

Дисбиоз кишечной микробиоты – это клинико-лабораторный синдром, развивающийся при нарушении нормального баланса микробного сообщества, характеризующееся снижением разнообразия полезных бактерий и увеличением представленности условно-патогенных микроорганизмов, что может приводить к нарушению функции кишечного барьера, иммунной дисфункции и снижению продуктивности животных. Разнообразие, состав и функция кишечной микробиоты свиней варьируют между особями и на протяжении различных стадий роста и зависят от факторов окружающей среды и генетических особенностей хозяина (Tang Q. et al., 2025).

Несмотря на то, что антибиотики положительно влияют на рост животных и эффективность использования корма, существуют риски появления устойчивых к ним бактерий и загрязнения окружающей среды. Исследования Pi Y. et al. (2019) показали, что антибиотики изменяют состав микробиоты кишечника свиней, снижая выработку короткоцепочечных жирных кислот и повышая концентрацию

генов устойчивости к антибиотикам (АРГ). Это способствует размножению патогенной микрофлоры, что еще больше усложняет поддержание здоровья кишечника. Следствием использования антибиотиков в сельском хозяйстве может стать распространение АРГ и устойчивых бактерий через навоз и сточные воды (Tang Q. et al., 2025).

Период отъема является критическим этапом для поросят, во время которого у 75% животных происходит сдвиг типа микробного сообщества. Отъем изменяет экспрессию кишечных генов, связанных с транспортом и метаболизмом нутриентов, вследствие изменений состава микробиоты. Постотъемный период характеризуется потерей микробного разнообразия, снижением представленности *Lactobacillus* и увеличением численности факультативных анаэробов, включая бактерии семейств *Enterobacteriaceae*, *Proteobacteriaceae*, *Clostridiaceae* и *Prevotellaceae*. Этот сдвиг может приводить к повышенной восприимчивости к патогенам и желудочно-кишечным расстройствам. По сравнению с подсосными поросятами, отъемыши имеют более высокую представленность генов, ассоциированных с тепловым шоком и окислительным стрессом в кишечной микробиоте (Tang Q. et al., 2025).

Состояние здоровья хозяина, включая заболевания и инфекции, также влияет на состав кишечной микробиоты. Разнообразие, состав и функциональная емкость фекальной микробиоты различаются у свиней с острой диареей и илеитом. Кишечные патогены, несмотря на вариабельность типов и патогенности, всегда инфицируют кишечные эпителиальные клетки, активируя иммунную систему хозяина и приводя к диарее (Tang Q. et al., 2025).

Инфекция ВЭДС перестраивает кишечную микробиоту, снижая представленность полезных бактерий *Lactobacillus* и увеличивая численность патогенных *Fusobacterium* и *Proteobacteria*. Продуцирование КЦЖК также изменяется при ВЭДС (Tang Q. et al., 2025).

Диарея, вызванная бактериями, вирусами или паразитами приводит к значительным изменениям в составе кишечной микробиоты. Исследования The H. C., Le S. N. H. (2022) показали, что на ранней стадии диареи снижается

таксономическое разнообразие. Происходят изменения, которые способствуют размножению быстрорастущих факультативных анаэробов, таких как *Proteobacteria* и *Streptococcus*. При этом сокращается количество облигатных анаэробных комменсалов кишечника, таких как *Blautia*, *Prevotella* и *Faecalibacterium*, что приводит к снижению содержания короткоцепочечных жирных кислот (Tang Q. et al., 2025).

У свиней, выращенных в разных условиях, микробиота кишечника различается. Например, по сравнению со свиньями, выращенными на решетчатом полу, у свиней, выращенных в сложной экосистеме с использованием соломы, наблюдалось снижение соотношения *Bacteroidetes/Firmicute* в бронхах, подвздошной и толстой кишке на 35,4%, 89,2% и 60,0% соответственно. Неблагоприятные таксоны *Psychrobacter*, *Corynebacterium*, *Actinobacteria* и *Neisseria* были характерны для микробного сообщества, связанного с группой в неблагоприятных условиях выращивания. А транспортировка с ферм на бойни вследствие стресса приводила к повышению частоты выявления *Salmonella* с 10,2% на ферме до 26,5% на бойне (Tang Q. et al., 2025).

Учитывая корреляцию между патогенами и кишечной микробиотой, восстановление полезных микроорганизмов может быть ключом к выздоровлению свиней от кишечных заболеваний. Пищевые добавки с побочными продуктами переработки риса, ферментированной соей и *Lactiplantibacillus plantarum* P-8 показали улучшение продуктивности свиней за счет снижения представленности бактериальных групп, негативно ассоциированных с ростом, при одновременном увеличении численности групп, положительно связанных с ростом свиней. Функциональный анализ показал, что пищевые добавки с пробиотиками увеличивают разнообразие и богатство микробного сообщества, ослабляют экспрессию генов иммунного ответа подвздошной кишки в направлении кишечного воспаления, повышают уровни интерлейкина-2 (IL-2) и IL-10 и снижают тяжесть диареи (Tang Q. et al., 2025).

1.5. Проблема антибиотикорезистентности в свиноводстве

Животноводческая отрасль является одним из ключевых источников распространения антибиотикорезистентных микроорганизмов и детерминант устойчивости к противомикробным препаратам. Использование антибактериальных средств в субингибиторных концентрациях для превентивной терапии инфекционных заболеваний животных, а также в качестве ростостимулирующих добавок, способствует аккумуляции резистентных бактериальных штаммов и генов резистентности в микробных сообществах животных и объектах производственной среды. Промышленное свиноводство представляет собой один из основных резервуаров формирования и циркуляции АРГ (Sedova D. A. et al., 2025).

С внедрением технологий высокопроизводительного секвенирования появилась техническая и экономическая возможность комплексной характеристики микробиомов сельскохозяйственных животных и ассоциированных с ними пулов генов резистентности. Показано, что метагеномные подходы обладают существенно более высокой эффективностью при оценке резистома по сравнению с традиционными фенотипическими методами (метод серийных разведений, диско-диффузионный метод). Метагеномное секвенирование является высокоинформативным инструментом мониторинга устойчивости к антимикробным препаратам (Sedova D. A. et al., 2025).

В работе Keum G.B et al. (2023) проводилась оценка представленности генов антибиотикорезистентности у поросят на этапах до и после отъема. В обеих возрастных группах были идентифицированы детерминанты устойчивости к ванкомицину (*vanW*, *vanR*, *vanS*), тетрациклинам (*tetQ*, *tetO*, *tetM*, *tetP*), метициллину (*murE*, *dltB*, *dltD*, *dltC*, *fmtB*), а также гены множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) (*macB*, *macA*). Примечательно, что результаты данного исследования не выявили увеличения численности антибиотикорезистентных бактерий, несмотря на подтвержденное возрастание

представленности АРГ, что было связано с изменениями рациона кормления после отъема (Keum G.B. et al., 2023; Sedova D. A. et al., 2025).

Метагеномное и метатранскриптомное профилирование генов антибиотикорезистентности в микробиомах кишечника человека, кур и свиней продемонстрировало, что 56,6% идентифицированных АРГ находились в транскрипционно активном состоянии, что указывает на то, что значительная часть генетических детерминант резистентности не экспрессируется. У свиней было обнаружено 151 тип АРГ, кодирующих устойчивость к 20 классам антибиотиков, включая гены резистентности к тетрациклинам (*tetQ*, *tetW*, *tetM*, *tetO*, *tetX*), аминогликозидам (*aph(3')-iiiia* и *aac(6')-ie-aph(2'')-ia*), линкозамидам (*ermF*, *ermB*, *lnuC*) и макролидам (*mefA*) (Keum G.B. et al., 2023; Sedova D. A. et al., 2025).

Навозные стоки животноводческих предприятий представляют собой резервуар генов антибиотикорезистентности, создающий потенциальную угрозу для здоровья как сельскохозяйственных животных, так и человека. Фекальные массы, содержащие неметаболизированные антибактериальные препараты, антибиотикорезистентные бактерии и АРГ, поступают в навозохранилища, где микроорганизмы подвергаются селективному делению, создавая благоприятные условия для формирования и распространения детерминант резистентности, в том числе посредством механизмов горизонтального переноса генов. Последующее применение навоза в качестве органических удобрений обеспечивает распространение антибиотикорезистентных бактерий и АРГ в почву, дренажные воды, поверхностные водоемы и грунтовые воды (Sedova D. A. et al., 2025).

Одним из эффективных методов редукции пула детерминант антибиотикорезистентности в навозе является его аэробное компостирование. Результаты исследований эффективности данного метода свидетельствуют, что компостирование обеспечивает более быструю и выраженную элиминацию мобильных генетических элементов, несущих АРГ, включая детерминанты множественной лекарственной устойчивости. Экспрессия генов устойчивости к тетрациклинам (*tetM*, *tetW*, *tetO*, *tetS*) снижалась в процессе компостирования,

однако данная технология не оказывала влияния на экспрессию генов устойчивости к сульфониламидам и фторхинолонам (Sedova D. A. et al., 2025).

Применение методов метагеномики и анализа микробиома кишечника свиней, а также объектов производственной среды на свинофермах может улучшить оценку потенциального распространения бактериальных таксонов и ассоциированных с ними АРГ как в пределах животноводческих комплексов, так и за их пределами. Комплексное метагеномное исследование 294 образцов, включающих фекалии свиней, образцы производственной среды фермы и мясоперерабатывающих предприятий, почвы и сточных вод, выявило наличие АРГ к 19 классам антибиотиков. Более того, 14 типов АРГ, принадлежащих к основному резистому, относились к классам антимикробных препаратов, определенным как «критически важные для медицины человека», среди них детерминанты устойчивости к гликопептидам (*vanI*, *vanRG* и *vanRB*), антимикробным пептидам (*PmrF* и *ugd*), фосфомицину (*Ctra_murA_FOF*), бета-лактамам (*Hinf_PBP3_BLA*), а также *TolC*, *msbA*, *poxA*, *Ecol_gyrA_FLO*, *efrA*, *evgA* и *adeF* (Sedova D. A. et al., 2025).

В Российской Федерации исследования в области метагеномики, транскриптомики и метаболомики микробиоты желудочно-кишечного тракта свиней, а также характеристики резистома, представлены в ограниченном объеме. Преимущественно исследования сосредоточены на фенотипическом определении чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам в условиях животноводства. Тем не менее, проведены работы по идентификации АРГ с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) фекальных образцов свиней на различных этапах онтогенеза (Sedova D. A. et al., 2025).

Применение клинически значимых антибактериальных препаратов в животноводстве является одним из факторов, способствующих формированию устойчивости бактерий к антибиотикам. Наиболее детально изучена проблема поступления АРГ в объекты окружающей среды с отходами животноводческих предприятий. Значительно менее исследованными остаются вопросы циркуляции

генетических детерминант лекарственной устойчивости в популяциях сельскохозяйственных животных, в том числе свиней.

1.6. Модели *in vitro* для изучения микробиоты свиней

1.6.1. Искусственные модели желудочно-кишечного тракта

Широкое внедрение и постоянное совершенствование *in vitro*-моделей желудочно-кишечного тракта открывает новые горизонты для фундаментальных и прикладных исследований. Эти модели, будучи альтернативой дорогостоящим и этически сложным клиническим и натурным испытаниям, позволяют с высокой степенью достоверности изучать сложные процессы, происходящие в пищеварительной системе, с особым акцентом на микробиоту (Gościński A. et al., 2022). Перспективные направления их применения выходят далеко за рамки нутрицевтики и включают области биобезопасности, изучения антибиотикорезистентности и оптимизации кормовых стратегий в животноводстве. Для осознанного выбора платформы для исследований необходимо понимать их ключевые особенности (Gościński A. et al., 2022).

Рассмотрим существующие модели.

SHIME - симулятор микробной экосистемы кишечника человека (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem). Создана в 1993 году и по сей день остается самой используемой динамической моделью имитации ЖКТ человека *in vitro* (Molly K., Vande Woestyne M., Verstraete W., 1993). Конструкция включает пять последовательно соединенных отсеков, имитирующих желудок, тонкую кишку, а также восходящий, поперечный и нисходящий отделы ободочной кишки (Van de Wiele T. et al., 2015).

Система содержит стеклянные сосуды с двойной рубашкой, которые соединены через перистальтические насосы, температура 37 °C. Первые два реактора работают по принципу "наполняй и вытягивай", добавляя три раза в день определенную питательную среду в желудочный отсек, а жидкость из

поджелудочной железы и желчи - в отсек тонкой кишки. После переваривания в желудочном и кишечном отделах суспензия перекачивается в восходящую ободочную кишку, где начинается переваривание в толстой кишке. Три отдела толстой кишки постоянно перемешиваются с поддержанием постоянного объема и уровня pH (Van de Wiele T. et al., 2015).

Среда состоит из сложных источников углеводов и белка с добавлением муцинов и минерально-витаминной смеси (Molly K. et al., 1993).

Вся система SHIME поддерживает анаэробные условия за счет ежедневной продувки свободного пространства соответствующих отсеков газообразным N₂ или смесью газов N₂/CO₂ в соотношении 90/10 % (Van de Wiele T. et al., 2015).

Экспериментальная схема включает четыре этапа (Van de Wiele T. et al., 2015):

- период стабилизации микробиоты (до 2 недель);
- базовый (контрольный) этап;
- фазу воздействия исследуемого соединения;
- фазу вымывания для оценки сохранности эффекта.

Существуют модификации системы: TWINSHIME - для параллельного сравнения контрольной и экспериментальной групп (García-Villalba R. et al., 2017), а также M-SHIME, включающая слой слизистой оболочки, что позволяет учитывать влияние мукозальной экологической ниши (Van den Abbeele P. et al., 2012). К преимуществам модели относят имитацию всех ключевых отделов ЖКТ и полную автоматизацию управления. Ограничением является отсутствие механики всасывания и перистальтики.

SIMGI - автоматизированный многокамерный симулятор ЖКТ.

Модель SIMGI разработана в Исследовательском институте пищевых наук (Испания) и представляет собой полностью автоматизированную систему, включающую камеры желудка, тонкой и толстой кишки (Barroso E. et al., 2015).

Желудочный модуль выполнен из двух метакрилатных цилиндров, создающих давление на силиконовый резервуар, благодаря чему моделируются перистальтические движения. Система позволяет контролировать pH и скорость

опорожнения. Тонкий кишечник представлен стеклянным реактором с двойной рубашкой и магнитным перемешиванием, куда поступает смесь желудочного содержимого с желчью и панкреатическим соком (pH 6,8; 37 °C; время прохождения - 2 часа) (Barroso E. et al., 2015).

Ферментационные процессы толстой кишки воспроизводят три анаэробных реактора, для которых поддерживается характерный градиент pH.

PolyFermS - полиферментная модель толстой кишки.

Модель PolyFermS предназначена для длительного культивирования неизмененного микробного сообщества, иммобилизованного в гелевых микрокапсулах диаметром около 1 мм, содержащих геллановую и ксантановую камедь, а также цитрат натрия (Gościński A. et al., 2022).

Система позволяет параллельно тестировать влияние различных воздействий на одну и ту же микробиоту. В реакторах поддерживается температура 37 °C, контролируемое значение pH и анаэробные условия. Заселение микрокапсул проходит в течение 48 часов, после чего возможен непрерывный отбор проб (Gościński A. et al., 2022). Модель обеспечивает высокую воспроизводимость и стабильность микробного сообщества.

TIM-2 - динамическая модель толстой кишки.

Модель TIM-2 (TNO Intestinal Model) представляет собой динамическую систему с компьютерным управлением, имитирующую проксимальный отдел толстой кишки (Cuevas-Tena M. et al., 2019). Система включает стеклянные реакторы с гибкой стенкой, перистальтические движения создаются за счет периодической подачи воды между стенками (Minekus M., 2015).

Важным преимуществом модели является имитация процессов всасывания и удаление продуктов метаболизма с помощью диализной системы. Питательная смесь SIEM вводится через подающую систему. Модель поддерживает pH 5,8, анаэробноз и температуру 37 °C. Перед экспериментом проводится период адаптации микробиоты (около 16 часов).

ECSIM - модульная система контроля условий толстой кишки

Система ECSIM разработана компанией Global Process Concept (Франция) и включает три независимых или комбинируемых реактора, соответствующих различным отделам толстой кишки (Molly K. et al., 1994; Macfarlane G. T., Macfarlane S., Gibson G. R., 1998).

Каждый бак оснащен водяной рубашкой, датчиками температуры, pH и окислительно-восстановительного потенциала, а также модулем контроля уровня жидкости/пены и системой автоматического отбора проб. Среда представляет собой смесь раствора микроэлементов, витаминов и базовой искусственной среды.

EnteroMix - четырехкамерная модель толстой кишки.

Модель EnteroMix воспроизводит четыре отдела толстой кишки человека, что позволяет учитывать естественный pH-градиент (5,5; 6,0; 6,5; 7,0) (МАеKIVUOKKO H. A. et al., 2006).

Температура поддерживается в термостатическом помещении (37 °C), анаэробные условия создаются подачей N₂. Перемещение содержимого между камерами осуществляется импульсами газа каждые 3 часа, длительность эксперимента составляет 48 часов. Имеет малые объемы камер (3–9 мл), что позволяет уменьшить расход реагентов и проводить быстрые тесты (МАеKIVUOKKO H. A. et al., 2006).

Ключевым ограничением современных моделей является отсутствие унифицированных методических подходов именно к воспроизведению условий кишечной среды. Существующие системы заметно отличаются по профилю pH, объему и составу питательных смесей, режиму перистальтики, а также по набору доступных субстратов, что приводит к высокой вариативности результатов (Gościński A. et al., 2022). Без стандартизированной, воспроизводимой кишечной среды, адаптированной под реальные физиологические параметры животных, невозможно обеспечить сопоставимость данных между исследованиями, корректно моделировать рост ключевых микробных групп и объективно оценивать влияние кормовых, пробиотических или антимикробных вмешательств (Gościński A. et al., 2022).

Исследование кишечной микробиоты в условиях *in vitro* позволяет отслеживать изменения в микробном составе, оценивать межмикробные взаимодействия и изучать влияние препаратов. Поэтому существует необходимость разработки экспериментальных платформ *in vitro*, которые помогут разрабатывать стратегии для повышения здоровья и продуктивности животных, а также снизить риски распространения АРГ.

1.6.2. Применение *in vitro* моделей для апробации антибиотиков, бактериофагов и пробиотиков

Модели имитации ЖКТ свиней являются инструментом для скрининга антибиотиков, пре-, про- и метабиотиков, а также бактериофагов. Такой подход позволяет оценить эффективность и безопасность исследуемых агентов, без проведения дорогих и сложных экспериментов на животных.

Эти модели позволяют в контролируемых условиях изучать влияние различных биологически активных агентов на состав и функциональную активность кишечной микробиоты, а также оценивать их потенциал в отношении целевых патогенов.

Модели *in vitro* активно применяются для изучения влияния антибактериальных препаратов на кишечную микробиоту свиней и оценки динамики формирования антибиотикорезистентности (Nissen L. et al., 2022). Использование искусственной кишечной среды позволяет проследить изменения в таксономическом составе микробного сообщества при введении субтерапевтических доз антибиотиков, применяемых в качестве ростостимуляторов, а также оценить восстановление микробиоты после прекращения антибиотикотерапии.

В исследовании Nissen L. et al. (2022) с использованием модели MICODE (Multi-Unit In Vitro Colon Model) была впервые оценена передача остаточных количеств амоксициллина через молоко и их влияние на микробиоту толстой кишки поросят. Результаты продемонстрировали эффективное воздействие

амоксциллина на микробиоту и продукцию метаболитов без изменения общего биоразнообразия. Наблюдалось снижение численности патогенных и оппортунистических таксонов (*Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*), но также уменьшение комменсальных *Lactobacillaceae*, редукция *Ruminococcaceae* и истощение полезных *Bifidobacteriaceae* при одновременном увеличении резистентных видов (*Enterococcaceae*, *Clostridiaceae*).

С учетом возрастающей проблемы антибиотикорезистентности, бактериофаги рассматриваются как перспективная альтернатива традиционной антибиотикотерапии в свиноводстве. *In vitro* модели кишечника свиней позволяют оценить литическую активность специфических фаговых препаратов в отношении целевых патогенов (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*) в контексте сложного микробного сообщества.

В исследовании Choi Y. et al. (2026) была продемонстрирована эффективность комбинированного применения коктейля из двух литических *Salmonella*-инфицирующих бактериофагов (SLAM_phiST45 и SLAM_phiST56) и пробиотической бактерии *Limosilactobacillus reuteri* (SLAM_LAR11) в модели цыплят, зараженных *Salmonella enterica* серовар Typhimurium. Результаты показали, что совместное применение фагов и пробиотика более эффективно элиминирует полирезистентную *Salmonella*, чем монотерапия фагами, что подчеркивает потенциал данной стратегии в качестве альтернативы антибиотикам.

In vitro модели широко применяются для скрининга пробиотических штаммов (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus faecium*) и оценки их функциональных свойств в контексте кишечной экосистемы свиней (Huangfu W. et al., 2024). Динамические ферментационные системы позволяют оценить способность пробиотических культур к колонизации просветной и муциновой фаз кишечника, их выживаемость в условиях низкого pH и присутствия желчных кислот, а также конкурентные взаимодействия с резидентной микробиотой.

Не менее важным является возможность изучения синбиотических вариаций. В исследовании Durif et al. (2025) авторы выяснили, что лактоза и лактоза +

сахароза не оказали существенного влияния на концентрацию короткоцепочечных жирных кислот, но увеличили газообразование ($P < 0,01$ при использовании лактозы). Оба сахара, особенно лактоза + сахароза, снижали концентрацию скатола, но повышали уровень индола ($P > 0,05$). Это было связано с небольшим снижением численности бактерий, продуцирующих скатол, *Olsenella scatoligenes* ($P > 0,05$). Оба кормовых ингредиента вызвали снижение α -разнообразия бактерий ($P < 0,05$). Механизмы действия до конца не изучены, но, скорее всего, они связаны с изменениями в составе микробиоты, которые благоприятно влияют на метаболические пути, приводя к снижению выработки скатола (например, уменьшение количества *Clostridium* при употреблении фруктоолигосахаридов). Результаты могут стать основой для использования простых сахаров в качестве кормовой добавки для улучшения качества мяса.

В соответствии с принципами 3R (Replacement, Reduction, Refinement), модели *in vitro* могут быть полезны для предварительного тестирования инновационных кормовых стратегий, направленных на улучшение здоровья свиней, а также для изучения механизмов их действия в отношении микробиоты кишечника с учетом индивидуальных различий. Также эти модели могут позволить сократить количество экспериментов на животных, снизить затраты и ускорить разработку новых препаратов и кормов для повышения продуктивности и поддержки здоровья свиней.

1.7. Ключевые параметры ЖКТ свиньи при *in vitro* моделировании кишечной микробиоты

Вязкость, кислотность, осмотическое давление и плотность являются важными параметрами для функционирования ЖКТ и микробиоты (Hornbuckle W.E., Tennant B.C., 1997). Они определяют качество ферментативных процессов и формирование условий роста и взаимодействия микроорганизмов. Например, вязкость слюны зависит от присутствия в ней муцина, который является гликопротеином. Структура муцина обеспечивается сиаловыми кислотами и определяет жесткость,

пространственную развернутость и устойчивость к протеолизу (Alpers D.H., 1969; Alpers D.H., Isselbacher K.J., 1967).

Вязкость и поверхностные свойства желчи зависят от желчных солей и фосфолипидов. Если концентрация солей превышает допустимую норму, формируются мицеллы, которые обеспечивают растворение продуктов липолиза и снижение вязкости. В системах типа «желчная соль - моноглицерид - жирная кислота - вода» критическая концентрация составляет около 2 мМ, в просвете тонкой кишки эта концентрация возрастает (Altamirano M., 1963; Alvarado F., 1966).

Параметром, который оказывает значительное влияние на моделирование *in vitro* является pH. Слюна обладает слабощелочным pH из-за высокого содержания бикарбонатов (Alvarado F., 1966). В желудке, напротив, экстремально низкий pH обусловлен секрецией соляной кислоты париетальными клетками, что необходимо для активации пепсина и создает выраженный бактерицидный барьер (Alvarado F., CRANE R.K., 1962). Панкреатический сок, напротив, имеет щелочную реакцию (pH 7,4–8,3) за счет бикарбонатов, обеспечивая нейтрализацию кислого химуса и оптимальные условия для работы ферментов тонкого кишечника (Anderson D. E., Rings M., 2008). В толстом отделе кишечника поддержание pH, близкого к нейтральному, является необходимым условием активности целлюлолитических бактерий, при снижении pH вследствие накопления молочной кислоты развивается ацидоз, сопровождающийся резким смещением микробного баланса (Argenzio R.A., 1975; Arroyo L.G., Stämpfli H.R., Weese J.S., 2006).

Осмотическое давление и плотность содержимого также играют существенную роль. Осмоляльность слюны варьирует у разных видов животных и зависит от скорости секреции (Aschaffenburg R., 1949). Физико-химические параметры напрямую отражаются на структуре микробных сообществ. В рубце, например, снижение pH ниже 6,0 подавляет активность целлюлозолитических видов и способствует доминированию *Streptococcus bovis* и других продуцентов молочной кислоты (Argenzio R.A., 1975; Arroyo L.G., Stämpfli H.R., Weese J.S., 2006). В тонком кишечнике нормальная микробиота ограничена действием желчных кислот, колебаниями pH и ферментами поджелудочной железы. Изменения

вязкости и кислотности могут приводить к синдрому избыточного бактериального роста и нарушению всасывания (Barros D'Sa A.A., Bloom S.R., Baron J.H., 1975; Bartley E.E., 1965). В толстом кишечнике микробиота активно трансформирует желчные кислоты - деконъюгирует их, проводит 7 α -дегидроксилирование, тем самым изменяя их поверхностно-активные свойства и способность солюбилизовать липиды (Batt R.M., Bush V.M., Peters T.J., 1979).

Физико-химические и реологические характеристики содержимого желудочно-кишечного тракта изучаются с применением комплекса экспериментальных подходов, отражающих многофакторную природу кишечной среды. Оценка реологических свойств содержания ЖКТ проводится с использованием различных методических подходов: для определения вязкости применяют капиллярную и ротационную вискозиметрию, а критическую мицеллярную концентрацию желчных солей определяют спектрофотометрическими методами по изменению светорассеяния или поверхностного натяжения (Altamirano M., 1963). pH-метрия, включая интралюминальные методы, позволяет отслеживать динамику кислотности в различных отделах ЖКТ, а титрование используется для изучения буферной емкости слюны и панкреатических секретов (Alvarado F., 1966; Anderson D. E., Rings M., 2008). Для изучения осмотического давления используют рефрактометрию и криоскопию. По данному параметру можно судить о концентрации растворенных веществ и отслеживать изменения условий внутренней среды (Batt R.M., Carter M.W., McLean L., 1984; Batt R.M. et al., 1992).

Химус свиней является дисперсной системой и включает в себя воду, пищевые волокна, слизь, белок, эпителиальные клетки, микробную биомассу и остаточные ферменты. Реология такого вещества не может быть постоянной. Она изменяется под действием рациона, потребления воды, температурой и в зависимости от отдела ЖКТ. При этом некрахмалистые полисахариды и пищевые волокна оказывают более сильное воздействие, так как способны изменять скорость транзита и ферментации химуса (Hung Y.T. et al., 2022).

Результаты исследований содержимого слепой кишки свиней подтверждают определяющую роль твердой фазы в формировании реологических характеристик

химуса. Интактное слепкишечное содержимое демонстрировало снижение коэффициента вязкости при увеличении скорости сдвига, то есть неньютоновское поведение. После удаления твердых частиц материал приобретал свойства низковязкой ньютоновской жидкости. Авторы связывают вязкоупругие свойства химуса преимущественно с присутствием непереваренных компонентов корма, растительных волокон, слущенных клеток эпителия и бактериальных клеток (Takahashi T., Sakata T., 2004).

Для свиней, получающих концентратные кукурузно-соевые рационы, вязкость жидкой фазы содержимого тонкого кишечника обычно невысока. Так, в исследовании Passos et al. вязкость супернатанта тощекишечного содержимого у поросят составила 2,52–3,20 сП, что эквивалентно 2,52–3,20 мПа×с. Однако перед измерением образцы подвергали двукратному центрифугированию, поэтому полученные данные характеризуют не цельный химус, а преимущественно его жидкую фазу (Passos A.A. et al., 2015)

В опыте Hung et al. (2022) вязкость супернатанта илеального содержимого находилась в диапазоне 1,28–11,25 мПа×с в зависимости от состава рациона и добавления карбоксиметилцеллюлозы. В то же время реологическое поведение цельного илеального химуса принципиально отличалось от поведения супернатанта. Измерения проводили на реометре при 39 °С в диапазоне скоростей сдвига от 0,1 до 100 с⁻¹, используя лопастной ротор и рифленую измерительную чашу, что позволяло учитывать присутствие твердых частиц. Для описания полученных данных использовали степенную модель:

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1},$$

где η - кажущаяся вязкость, K - индекс консистенции, $\dot{\gamma}$ - скорость сдвига, а n - индекс течения. Для цельного илеального содержимого значения K находились в диапазоне 3,52–7,48, а индекс течения n - от 0,18 до 0,40. Значения $n < 1$ подтверждают выраженную псевдопластичность цельного химуса.

Таким образом, низкие значения вязкости, измеряемые в центрифугированном супернатанте, нельзя напрямую сопоставлять с вязкостью гомогенизированного либо цельного кишечного содержимого. Удаление взвешенных частиц,

растительных волокон и микробной биомассы приводит к существенному снижению вязкости и утрате значительной части структурно-механических свойств исходного химуса.

Физико-химические параметры определяют не только активность ферментов и характер пищеварения, но и устойчивость микробных сообществ на всех уровнях, от рубца и тонкого кишечника до толстой кишки.

Не менее важным параметром для моделирования процессов ЖКТ является субстратный состав искусственного химуса. Основу углеводного блока среды составляют пектин, ксилан, арабиногалактан, амилопектин и крахмал, отражающие характер поступающих в кишечник субстратов при зерновых и комбикормовых рационах, типичных для свиней. Эти полисахариды ферментируются различными группами микроорганизмов, включая представителей родов *Bacteroides*, *Prevotella*, *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, с образованием короткоцепочечных жирных кислот, которые являются универсальными метаболитами кишечной микробиоты и играют ключевую роль в поддержании эпителиального гомеостаза и энергетического обмена (Blanco-Pérez F. et.al, 2021; Yang Z. et.al., 2022; Solihin J., Waturangi D.E., Purwadaria T., 2021).

В рационе свиней присутствуют сложнорасщепляемые белки, пептиды и аминокислоты. Поэтому в составе ИКС присутствуют казеин и бактопептон, которые помогают воспроизводить протеолитические процессы в тонком отделе кишечника. Метаболизм белков оказывает сильное влияние на функциональное состояние микробиоты (Seung D., 2020; Abou Dohara M.I. et.al., 2011).

Для создания условий липидного обмена в ИКС вводится желчь и Твин-80. Они оказывают селективное давление на микробиоту и формируют среду сходную с физиологической средой в кишечнике свиньи. Также эти компоненты поддерживают рост бактерий и моделируют процессы, происходящие в проксимальных отделах кишечника (Favero M.S. et.al., 1968; Campbell C. et.al. 2020).

Минеральная составляющая среды представлена $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $NaCl$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Эти компоненты поддерживают

осмотическое давление, буферные свойства и доступность микроэлементов для микроорганизмов. Железо и гемин являются важным компонентом для роста облигатных и факультативных анаэробов (Piwowarski J.P. et.al., 2016).

Введение цистеина HCl помогает снижать окислительно-восстановительный потенциал и создавать условия для роста анаэробной микрофлоры ЖКТ (Takagi H., Ohtsu I., 2017).

Не менее важным компонентом является витаминный состав, который содержится как в корме, так и синтезируется бактериями. Добавление витаминов группы В, таких как тиамин, никотинамид, пантотенат, биотин, витамин В₁₂, менадион, п-аминобензойная кислота помогает метаболической функции микробных сообществ. Эти соединения участвуют в синтезе нуклеиновых кислот и коферментов, в энергетическом обмене (Dial C.N. et.al., 2021; Shats I. et.al., 2020; Nosaka K., 2006; Satiaputra J. et.al., 2018; Tahiliani A.G., Beinlich C.J., 1991).

1.8. Искусственные кишечные среды

Традиционный метод выделения и культивирования микробов в основном основан на использовании чашек Петри, таких как метод «сэндвич» и метод «стриппинг». При соответствующих условиях колонии могут развиваться на твердых питательных средах и быть видимыми невооруженным глазом без увеличения (Xu M. Q. et al., 2024). На практике при прямом подсчете микроорганизмов под микроскопом в природных образцах обнаруживается большее их количество, чем при подсчете на чашках Петри, что известно как феномен большой аномалии при подсчете на чашках Петри (Staley J. T., Конорка А., 1985). Эта разница может быть связана с тем, что питательная среда не в точности воспроизводит реальную природную среду, в результате чего большинство микроорганизмов не могут в ней развиваться. Среди других факторов — симбиоз между клетками или жизнеспособными, но не образующими колонии клетками (Xu M. Q. et al., 2024).

Дополнительную роль играют клеточные взаимодействия (например, симбиотические зависимости) и существование жизнеспособных, но не культивируемых форм (VBNC). Для микроорганизмов, неспособных образовывать колонии на твердых средах, альтернативой служит метод предельных разведений в жидких субстратах, позволяющий получать культуры отдельных клеток. Этот подход также обеспечивает более простую организацию эксперимента и высокую производительность. Примером является работа Goodman A. L. et al. (2011), в которой была разработана специализированная среда для кишечной микробиоты, после чего осуществлено предельное разведение в микропланшетах на 384 лунки. В результате из одного донорского образца кала было выделено 1172 изолята, относящихся к 48 установленным видам, а также ряду ранее культивируемых представителей. Большинство кишечных микроорганизмов являются строгими анаэробами, что предопределяет необходимость применения сложных обогащенных сред и специализированного оборудования. Традиционно для их культивирования используется метод Хангейта (Holdeman L. V., Moore W. E. C., 1972), а в небольших лабораториях - химические анаэробные системы, такие как AnaeroPack (Delaney M. L., Onderdonk A. B., 1997) и BBL GasPak (Collee J. G. et al., 1972). Развитие технологий привело к появлению анаэробных камер с автоматическими рабочими станциями, однако высокая стоимость и сложность эксплуатации существенно ограничивают их доступность (Xu M. Q. et al., 2024).

1.8.1. Среда для модели PolyFermS (проксимальный отдел толстой кишки взрослых свиней)

Для имитации условий проксимального отдела толстой кишки свиней в рамках модели PolyFermS была разработана специализированная питательная среда, адаптированная из среды Macfarlane et al., с модификацией концентраций углеводов и белков для более точного воспроизведения подвздошного химуса. Расчет концентраций ингредиентов основывался на стандартном кукурузно-соевом рационе свиней, включающем кукурузу (641 г/кг) как основной углевод и соевый

шрот (331 г/кг) как основной источник азота. При расчетах применялись коэффициенты перевариваемости 97% для кукурузного крахмала и 82,5% для соевого шрота при суточном потреблении корма 2 кг на животное, что дало соотношение крахмал:азотсодержащие соединения 25:75 (Tanner S. A., et al. 2014).

Количество кукурузного крахмала (4,3 г/л) и соевого пептона (13 г/л), ежедневно подаваемых в модель, было рассчитано с применением коэффициента 0,09, учитывающего фактический объем проксимального отдела толстой кишки *in vivo* (около 2,9 л по сравнению с объемом проксимального реактора модели (260 мл)). Крахмал является ферментируемым углеводом, а пептон источником белка и азота. Для того, чтобы имитировать эндогенную секрецию вводили муцин и дрожжевой экстракт. Также вводили витаминный раствор и минералы (Tanner S. A., et al. 2014).

Среднее время нахождения питательной среды в модели 9 часов при температуре 38 С, скорость перемешивания 120 об/мин, скорость подачи 26 мл/ч, рН 6,0. Корректировка значений рН регулировалась автоматически раствором NaOH. Соблюдались анаэробные условия. После 10-дневной стабилизации средняя концентрация общих КЦЖК составила $180,1 \pm 5,8$ мМ для реактора-инокулятора и $174,4 \pm 7,6$ мМ для контрольного реактора. Соотношение ацетат:пропионат:бутират (61:27:12 и 57:29:14 соответственно) хорошо согласовалось с данными для проксимального отдела толстой кишки свиней *in vivo* (60:25:15). Модель демонстрировала стабильность микробного состава и метаболической активности в течение 54 дней непрерывной ферментации (Tanner S. A., et al. 2014).

1.8.2. Среда для модели baby-SPIME (поросята на подсосе)

Для моделирования желудочно-кишечного тракта поросят-сосунов разработана среда Lactation culture medium, учитывающая особенности пищеварения молочных продуктов. Основу составляли муцин (6,0 г/л) для имитации защитного слоя слизистой, протеозо-пептон (1,0 г/л) как источник пептидов, картофельный

крахмал (1,0 г/л) в ограниченном количестве для отражения незрелости пищеварительной системы, L-цистеин гидрохлорид (0,2 г/л) как редуцирующий агент и Nuklospray Yogurt (8,0 г/л) – коммерческий заменитель молока, содержащий сывороточный порошок, растительные масла (пальмовое, кокосовое), пшеничную муку, декстрозу и минеральные компоненты (Dufourny, S., 2022).

Панкреатический сок готовился отдельно и содержал натрия гидрокарбонат (2,5 г/л), панкреатин (0,9 г/л) и бычью желчь Oxgall (4,0 г/л). Биореакторы модели имитировал подвздошную кишку объемом 100 мл и проксимальный отдел толстого кишечника объемом 250 мл. Для моделирования подвздошной кишки поддерживали уровень pH 6,4-6,6, температура 39,5 °C, время удержания 4 часа. Проксимальный отдел толстого кишечника поддерживал pH 5,8-6,0, время удержания 10 часов (Dufourny, S., 2022).

1.8.3. Среда для модели Pigut-IVM (послеотъемные поросята)

Pigut-IVM — это непрерывная модель толстой кишки поросят. Биореакторы MiniBio объемом 500 мл), оснащенные мешалками, портами и датчиками, использовались в непрерывном режиме для моделирования среды толстой кишки. Для инокуляции одного биореактора фекалии 6–8 поросят, содержащихся в одном стойле, общим весом 10 г, были объединены и смешаны в анаэробных условиях со стерильным фосфатно-солевым буфером (30 ммоль/л, pH 6,0) до достижения общего объема 50 мл. В каждый биореактор добавляли 50 мл фекальной суспензии в 150 мл питательной среды. Температура ферментации была установлена на уровне 39 °C, что соответствует физиологической температуре толстой кишки поросят. Кишечная среда содержит в г/л: пшеничный крахмал -5,0; пектин – 2,0; арабиногалактан -2,0; целлюлоза -2,0; изолят соевого белка – 10,0; триптон из казеина - 4,5; муцин из желудка свиньи типа II – 2,0; сывороточный порошок – 5,0; FeSO₄, 7H₂O - 0,005; L-цистеин HCl моногидрат - 0,8; экстракт желчи свиной - 0,4; KH₂PO₄ - 0,5; NaHCO₃ - 1,5; гемин свиной - 0,005; NaCl - 4,5;

KCl - 4,5; безводный MgSO₄ (120,37 г/моль) - 0,64; CaCl₂ 2H₂O (147,02 г/моль) - 0,15; MnCl₂ 4H₂O (197,91 г/моль) - 0,2 (Gresse R. et al., 2021).

1.8.4. Искусственная кишечная модель толстого кишечника поросят с муциновыми шариками (MPigut-IVM)

M-Pigut-IVM (Mucosal Pig gut In Vitro Model) — это адаптация Pigut-IVM, использующая отсек с муциновыми шариками и имитирующая лишение пищи во время отъема от матери (Gresse R. et al., 2021).

Муциновый компартмент формируется из альгинат-муциновых гранул (5% муцина типа II из желудка свиньи и 2% альгината натрия), обеспечивающих общую площадь поверхности 723 см² для колонизации пристеночной микробиоты. Биореакторы инокулируются фекальными образцами взрослых свиней (24-29 недель), после чего проводится 24-часовая периодическая ферментация для амплификации микробиоты и 7-дневная непрерывная ферментация для стабилизации микробного сообщества (Gresse R. et al., 2021).

Валидация модели через сравнение *in vitro-in vivo* данных продемонстрировала высокую степень соответствия по составу КЦЖК (ацетат ~60%, пропионат ~25%, бутират ~15%), концентрациям КЦЖК (133 мМ/сутки *in vitro* vs 108 мМ/сутки *in vivo*) и окислительно-восстановительному потенциалу (-255 мВ *in vitro* vs -285 мВ *in vivo*) (Durif et al., 2025). Таксономический состав микробиоты на уровне филумов и семейств также соответствовал *in vivo* данным, включая доминирование Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria (Durif et al., 2025).

Анализ существующих подходов к культивированию кишечной микробиоты показывает, что ни одна из доступных питательных сред не способна полноценно воспроизвести совокупность химических, метаболических и физиологических условий, характерных для желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных. Перечисленные среды воссоздают конкретные части ЖКТ, а не весь комплекс. Это лишает возможности проанализировать межвидовые воздействия, влияющие на функционирование микробиоты *in vivo*.

Поэтому необходимо создать комплексную стандартизированную систему имитации ЖКТ, которая обеспечит наличие субстратов для разных отделов ЖКТ, будет воспроизводить диапазоны pH и стремиться к воспроизведению реальной биохимии и реологии кишечного содержимого.

1.9. Заключение к обзору литературы

Микробиота ЖКТ это сложная и динамичная система, которая требует соблюдение физико-химических, биохимических и микробиологических характеристик. Баланс микробных сообществ зависит от возраста животных, характера кормления, действия стрессовых факторов и применения антибактериальных препаратов (Ma Y. et al., 2026). Бактерии участвуют в процессах ферментации и метаболизма, обеспечивая организм витаминами и микроэлементами. Помимо бактерий в микробиоте присутствуют вирусы, археи и грибы. При этом плотность бактерий в различных отдел варьируется. Например, в слепой и толстой кишке ее уровень достигает 10^{11} – 10^{12} КОЕ/г, тогда как в желудке и тонкой кишке этот показатель значительно ниже (10^7 – 10^9 КОЕ/г) (Nguyen H.T. et.al., 2022; Kiyoto S. et.al., 2018). Это зависит от различий условий отделов ЖКТ, таких как pH, концентрация кислорода и доступность питательных веществ.

Для исследования кишечной микробиоты необходим комплексный методический подход. Культуральные методы позволяют оценивать жизнеспособную и культивируемую часть микробного сообщества, выделять чистые культуры и определять их фенотипические свойства, включая антибиотикочувствительность (Lagier J.C. et al., 2018; Mun D. et al. 2021; Sedova D. A. et al., 2025). Молекулярно-генетические методы, в том числе количественная ПЦР в реальном времени и секвенирование гена 16S рРНК, обеспечивают количественную оценку целевых групп микроорганизмов, характеристику таксономической структуры и разнообразия микробиоты (Fu H. et al., 2021; Sedova D. A. et al., 2025). Биохимические методы дополняют эти данные сведениями о метаболической активности микробного сообщества (Vasquez R. et al., 2022).

Современные статические и динамические *in vitro*-модели позволяют контролировать отдельные параметры пищеварительной среды и использовать их

для предварительной оценки кормовых добавок, антибактериальных препаратов, бактериофагов и пробиотиков (Dufourny, S., 2022; Gresse R. et al., 2021; Tanner S. A., et al. 2014; Nissen L. et al., 2022; Huangfu W. et al., 2024; Gościński A. et al., 2022; МАеKIVUOKKO H. A. et al., 2006; Molly K. et al., 1994; Cuevas-Tena M. et al., 2019; Barroso E. et al., 2015; Van de Wiele T. et al., 2015). Вместе с тем анализ существующих моделей показал, что многие из них преимущественно ориентированы на отдельный возрастной период животных, определённый отдел кишечника или моделирование толстокишечной ферментации. Состав используемых питательных сред, режимы культивирования, способы воспроизведения ферментативной активности, pH, вязкости и анаэробных условий существенно различаются. Это ограничивает сопоставимость результатов и воспроизводимость исследований.

Разработка стандартизированной искусственной кишечной среды, учитывающей физико-химические, реологические, ферментативные и субстратные характеристики кишечного содержимого, позволит повысить физиологическую точность *in vitro*-моделирования. Контроль pH, температуры, анаэробных условий и подачи питательной среды создаст условия для воспроизводимого культивирования микробных сообществ и предварительной оценки действия кормовых, антибактериальных и пробиотических средств.

ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Объекты исследования

Объектом исследования являлась кишечная микробиота свиней (*Sus scrofa domestica*). Выбор данных видов обусловлен их физиологическим сходством с моделью ЖКТ человека, а также их значением в ветеринарной и аграрной практике (Плаксин И.Е., Плаксин С.И., Трифанов А.В., 2022.).

Материалом для исследования служило содержимое различных отделов желудочно-кишечного тракта, таких как тонкий и толстый кишечник, использованные для создания *in vitro* моделей микробиоты. В работе анализировались условия культивирования и состав кишечной среды, оптимизированные для свиней.

Культуры микроорганизмов были выделены из кишечного содержимого свиней и идентифицированы методами классической микробиологии, MALDI-TOF MS, молекулярно-генетическими методами и ПЦР в реальном времени. Выделенные изоляты представляли основные таксономические группы кишечной микробиоты свиней: *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Bacillus spp.*. Изоляты *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.* были дополнительно охарактеризованы на наличие антибиотикорезистентности. Также в исследовании использовали пробиотическую культуру *Bacillus subtilis* для оценки ее адаптогенных свойств и выживаемости в условиях *in vitro* модели кишечной среды свиней.

Все работы, связанные с животными, были проведены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных (CIOMS, 2012), Приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики» и одобрены Этическим комитетом (заключение локального независимого этического

комитета Донского государственного технического университета №6 от 04.11.2024 г.).

2.1.2. Оборудование, реактивы и расходные материалы

2.1.2.1. Установка иЖКТ

Создание лабораторного прототипа автоматизированной системы имитации ЖКТ свиньи, представленного на рисунке 1, базировалось на инженерном подходе с использованием результатов аналитического обзора и систематизации научных данных о конструкционных решениях различных искусственных пищеварительных систем, применяемых в медико-биологических экспериментах.

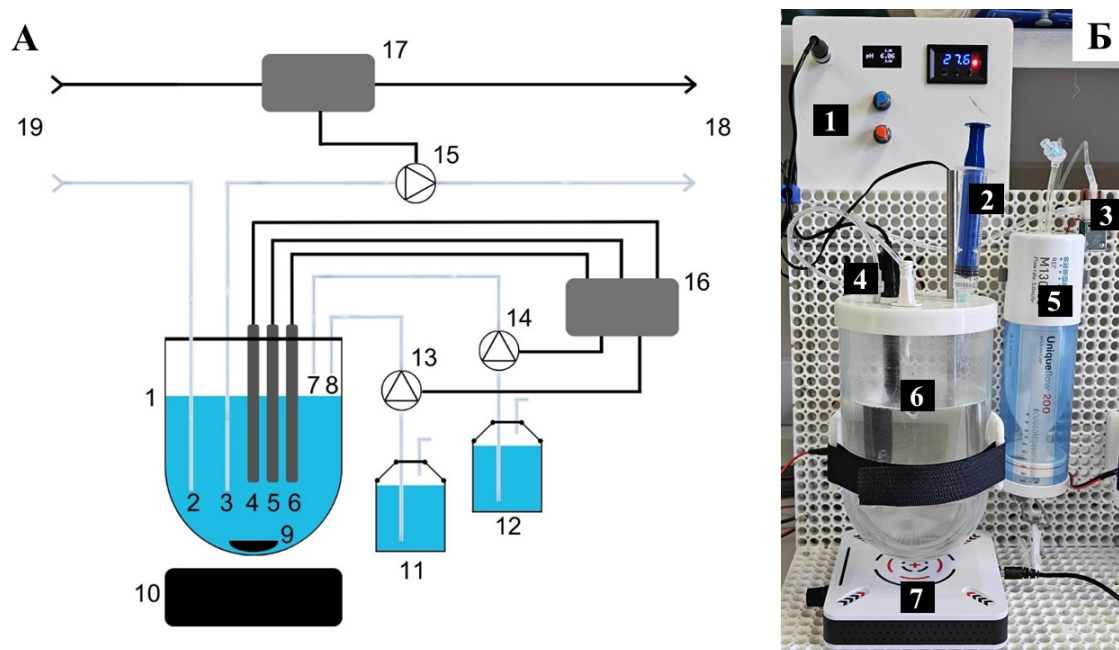


Рисунок 1 - Схема модульной секции искусственного желудочно-кишечного тракта свиньи (А): 1 – резервуар, 2 – магистраль подачи содержимого от предыдущего отдела, 3 – магистраль подачи в следующий отдел, 4 – нагревательный элемент, 5 – датчик рН, 6 – датчик температуры, 7 – магистраль подачи щелочного агента, 8 – магистраль подачи кислотного агента, 9 – якорь магнитной мешалки, 10 – привод магнитной мешалки, 11 – емкость с кислотным агентом, 12 – емкость с щелочным агентом, 13 – помпа кислотного агента, 14 – помпа щелочного агента, 15 – помпа транспорта между секциями устройства, 16 –

устройство автоматического управления параметрами секции, 17 – устройство автоматического управления транспортом между секциями, 18 – подключение к следующей секции, 19 – подключение к предыдущей секции. Общий вид модуля (Б): 1 – корпус системы управления, 2 – шприц с кислотным агентом, 3 – электромагнитный клапан подачи щелочного агента; 4 – подключение проводящей магистрали к биореактору, 5 – помпа долгосрочной инфузии с щелочным агентом, 6 – биореактор, 7 – привод магнитной мешалки (Ханукаев М. М., Шебеко С.К., Ярамышев М.Я., 2024; Ханукаев М. М. с соавт., 2025).

Компоненты использованные для сборки системы имитации ЖКТ приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень компонентов, использованных при сборке лабораторного прототипа системы имитации ЖКТ свиньи (Портнова Е.А., 2026)

Компонент	Модель/номинал	Количество
Дисплей	OLED 1,3”	3
Потенциометр	10 кОм	6
Датчик pH	P4PM	3
Основание системы креплений	200x300x10 мм	6
Профиль конструкционный с набором креплений	20x20x1000 мм	6
Колба реакционная	1 л	1
Колба реакционная	0,5 л	1
Колба реакционная	1,5 л	1
Мешалка магнитная	500-2500 об./мин	3
Термостат	W1209	3
Термистор	47 кОм	3
Помпа долгосрочной инфузии	Uniqueflow 200 мл	2
Помпа долгосрочной инфузии	Uniqueflow 100 мл	1
Термогильза	8x200 мм	3
Клапан электромагнитный	12 В	6
Микроконтроллер	Atmel Atmega 328P	3

Окончание таблицы 1

Компонент	Модель/номинал	Количество
Реле электромагнитное	12 В	6
Удлинитель линии инфузионной	1 м	3
Блок питания	12 В, 150 Вт	1
Лента термоизоляционная	40x5x1000	1
Нагреватель пленочный	12 В, 17 Вт	3

Компоненты системы монтировали на лабораторном стенде, выполненном на базе соединяемых блоков быстрого монтажа.

Конструкционные детали получали методом 3D-печати: цифровые модели создавали в программе Компас 3D, а физические объекты изготавливали на принтере Creality K1C из термопластичного полиуретана или ABS-пластика методом послойного наплавления (Портнова Е.А., 2026).

2.1.2.2. Реактивы и расходные материалы

Растворение компонентов: все компоненты среды растворяли в 1 литре дистиллированной воды, полученной с помощью Система водоочистительная лабораторная, вариант исполнения: Milli-Q Reference при постоянном перемешивании на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 (Германия) со скоростью 600 об/мин при температуре 50 °С.

Автоклавирование: подготовленная смесь автоклавировалась в стерилизаторе паровом модель 5075 ELV-WR (Израиль) при температуре 134 °С и давлении 2 атм в течение 30 минут для стерилизации.

Измерение pH питательных сред и реакционных смесей выполняли с помощью pH-метра ST2100-F производства OHAUS (США) с электродом STTEMP30. Прибор обеспечивал точность измерения $\pm 0,01$ единицы pH в диапазоне от 0,00 до 14,00 с температурной компенсацией до ± 1 °С. Калибровку pH-метра проводили перед каждой серией измерений с использованием стандартных буферных растворов.

Культивирование микроорганизмов проводили в термостате ТС-200 СПУ (1014) (Россия) при температуре 37°C. Все манипуляции с микробными культурами выполняли в асептических условиях в ламинарном боксе биологической безопасности с вертикальным потоком воздуха Faster FlowFAST V 12 P (Италия).

Базовую среду готовили на основе 1 л дистиллированной воды с последовательным добавлением следующих компонентов. В качестве источников углеводов использовали пектин (galactosan aldehyde acid, $\geq 74,0\%$, Macklin, Китай) в количестве 9,0 г/л, ксилан из кукурузного початка ($\geq 90\%$, Macklin, Китай) – 9,0 г/л, арабиногалактан из древесины лиственницы (Macklin, Китай) – 9,0 г/л, амилопектин (Macklin, Китай) – 9,0 г/л и крахмал из картофеля (Macklin, Китай) – 50,0 г/л. Белковую основу среды составляли казеин (BR, Macklin, Китай) в концентрации 43,7 г/л и бактопептон (Macklin, Китай) – 43,7 г/л.

Для имитации желчных кислот добавляли стерильную бычью желчь в виде говяжьего желчного порошка ($\geq 45\%$, Macklin, Китай) в количестве 0,7 г/л. Минеральный состав среды обеспечивали внесением $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (калий фосфат двухосновный, Россия) – 4,7 г/л, NaCl (хлорид натрия, $>98\%$, Россия) – 8,4 г/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (гептагидрат сульфата железа(II), для культуры растительных клеток, $\geq 99\%$, ACS reagent, CDH, Индия) – 0,009 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (сульфат магния безводный, $>98\%$, Россия) – 0,7 г/л и $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (кальция хлорид безводный, Россия) – 0,8 г/л.

В качестве факторов роста для анаэробных микроорганизмов вносили гемин (хемин, 98%, Macklin, Китай) в концентрации 0,02 г/л и п-аминобензойную кислоту (парааминобензойная кислота, $>98\%$, CDH, Индия) – 0,2 г/л.

Полученную смесь автоклавировали при температуре 134°C и давлении 2 атм в течение 30 минут. После охлаждения среды до комнатной температуры в асептических условиях вводили термолабильные компоненты: твин-80 (полиоксиэтанндиоловые производные сорбитан-9-октадеканата, Macklin, Китай) – 31,5 г/л, никотинамид (CDH, Индия) – 2,5 г/л, тиамин гидрохлорид ($>98\%$, Россия) – 0,004 г/л, L-цистина дигидрохлорид (99%, Macklin, Китай) – 0,003 г/л, менадион

(витамин К3, 98%, Macklin, Китай) – 0,001 г/л, D-биотин (Himedia, Индия) – 0,002 г/л, витамин В₁₂ (Россия) – 0,0005 г/л, D-пантотенат кальция (99%, Macklin, Китай) – 0,01 г/л и никотиновая кислота (Россия) – 0,005 г/л.

Модуль I (тонкий кишечник) содержал базовый состав среды с добавлением микрокристаллической целлюлозы (Россия) в концентрации 5 г/л. Для обеспечения ферментативного расщепления белков и углеводов при pH 6,8–7,2 вносили трипсин из бычьей поджелудочной железы (0,22 мкм, фильтрованный, ≥180 единиц/мг белка, Macklin, Китай) – 3 мг/л, α-химотрипсин из поджелудочной железы крупного рогатого скота (≥45 ед/мг белка, Macklin, Китай) – 1 мг/л, панкреатин (Фармстандарт-Лексредства ОАО, Россия) – 3,5 г/л.

Модуль II (толстый кишечник) на основе базового состава характеризовался повышенным содержанием микрокристаллической целлюлозы (Россия) – 9 г/л, pH 6,5–6,8, что воспроизводило высокую концентрацию непереваримых субстратов и обеспечивало условия для роста анаэробной микрофлоры.

Для культивирования микроорганизмов использовались следующие питательные среды: среда Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Энтерококкагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Среда Вильсона-Блэра и Мюллер-Хинтона, MRS-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Бифидум-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), агар LB (AppliChem, Германия), ГРМ-агар и тиогликолевая среда (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Экстракцию ДНК осуществляли набором ДНК-сорб-В (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) и SKY Amp Genomic DNA Kit, EDC304 (SkyGen, Россия). Флуоресцентную детекцию продуктов амплификации осуществляли в режиме реального времени с использованием детектирующего амплификатора ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия) в соответствии с инструкцией к набору «Колонофлор-16 (биоценоз)» (Альфалаб, Россия).

2.1.3. Разработка кишечной среды

2.1.3.1. Приготовление

Базовый состав среды готовился следующим образом. На 1 л дистиллированной воды последовательно добавляли следующие компоненты (г/л): пектин – 9,0; ксилан – 9,0; арабиногалактан – 9,0; амилопектин – 9,0; казеин – 43,7; крахмал – 50,0; бактопептон – 43,7; стерильная бычья желчь – 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; п-аминобензойная кислота – 0,2. Смесь автоклавировали при 134 °C и давлении 2 атм в течение 30 минут. После охлаждения в асептических условиях вводились чувствительные к нагреванию компоненты: твин-80 – 31,5; никотинамид – 2,5; тиамин – 0,004; цистеин·HCl – 0,003; менадион – 0,001; D-биотин – 0,002; витамин B₁₂ – 0,0005; пантотеновая кислота – 0,01; никотиновая кислота – 0,005 (Тихменева (Ярушникова) Ю.А. с соавт., 2025).

Все компоненты смешивали при постоянном перемешивании на магнитной мешалке ИКА С-MAG HS 7 со скоростью 600 об/мин при температуре 20 °C. Контроль pH осуществляли с помощью pH-метра ST2100-F в комплекте с пластиковым электродом и датчиком температуры STTEMP30.

Моделирование осуществляли с использованием экспериментальной установки искусственного желудочно-кишечного тракта (иЖКТ), что обеспечивало более полное воспроизведение пространственно-временной организации пищеварения, включая последовательную смену физико-химических условий и ферментативных процессов. Базовая унифицированная кишечная среда была разработана именно с учетом дальнейшей интеграции в прототип иЖКТ и использовалась как основа для всех этапов культивирования.

Разработанная искусственная кишечная среда была реализована в виде двух взаимосвязанных модулей, каждый из которых воспроизводил физико-химические и биохимические параметры соответствующего отдела ЖКТ свиньи.

Модуль I, имитирующий тонкий отдел кишечника состоит из базового состава ИКС, микрокристаллической целлюлозы (5 г/л), трипсина (3 мг/л), химотрипсина (1 мг/л) и панкреатина (3,5 г/л). pH поддерживается на уровне 6,8-7,2.

Модуль II, имитирующий толстый отдел кишечника состоит из базового состава с повышенным содержанием микрокристаллической целлюлозы – 9 г/л. Это создает условия для роста анаэробной микрофлоры. pH поддерживается на уровне 6,5-6,8.

2.1.3.2. Стерилизация кишечной среды

После приготовления ИКС разливали в предварительно стерилизованные банки из стекла объемом 1 л. Банки заполняли на 70%, чтобы избежать разбрызгивания среды при автоклавировании. Крышки закручивались не полностью для поступления пара, сверху накрывали крафтовой бумагой. Режим автоклавирования – 30 минут при температуре 134°C и избыточном давлении 2 атм. Данный режим обеспечивает гибель вегетативных форм и спор микроорганизмов при сохранении химической стабильности основных компонентов среды.

После завершения цикла автоклавирования и снижения температуры до 40-45°C в среду в асептических условиях ламинарного бокса вносили термолабильные компоненты.

2.1.4. Изучение физико-химических свойств искусственной кишечной среды

2.1.4.1. Реологические свойства

Для варьирования плотности и вязкости среды готовили два варианта состава - разбавленный (500 мл среды + 300 мл воды) и неразбавленный. Все образцы тщательно перемешивали до однородности и подвергали дегазации для удаления растворенного кислорода.

Вязкость образцов определяли на ротационном вискозиметре Thermo Scientific HAAKE Viscotester C при температуре $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ с использованием шпинделей L2 и L4. Для каждой пробы фиксировали значения вязкости ($\text{мПа}\cdot\text{с}$) при последовательном увеличении скорости вращения шпинделя (20, 30, 50, 60 и 100 об/мин). Для минимизации ошибок, связанных с нестабильностью потока, измерения выполняли после достижения установившегося момента сопротивления.

На основании полученных данных строили кривые зависимости вязкости от скорости вращения шпинделя, отражающие реологическое поведение среды. Для оценки физиологичности состава показатели сравнивали с литературными данными о вязкости кишечного содержимого свиней (Hung et al., 2022), где описан псевдопластический тип поведения и диапазон вязкости в зависимости от скорости сдвига.

На основании анализа полученных кривых определяли диапазон вязкости, обеспечивающий условия, близкие к физиологическим параметрам перистальтического перемещения химуса в *in vitro*-модели. Этот диапазон использовался для выбора оптимального состава среды, соответствующего по реологическим характеристикам содержимому ЖКТ свиней *in vivo*.

Разработанная многофазная модель искусственной кишечной среды предназначена для *in vitro*-моделирования микробиоты различных отделов ЖКТ свиней. Концепция модели основана на воспроизведении биохимического и ферментативного градиента вдоль тракта. Каждая фаза отличается уровнем кислотности, ферментным составом, содержанием муцинов и источников углерода, что позволяет имитировать естественную динамику химуса и обеспечивать оптимальные условия для роста и метаболической активности кишечных микроорганизмов.

2.1.4.2. Определение pH среды

Контроль pH среды осуществляли на всех этапах приготовления с использованием настольного pH-метра ST2100-F, оснащенного комбинированным пластиковым электродом ST210 и встроенным датчиком температуры STTEMP30. Прибор обеспечивает точность измерения $\pm 0,01$ единиц pH в диапазоне 0,00–14,00 с автоматической температурной компенсацией.

Перед началом измерений pH-метр калибровали по двум точкам с использованием стандартных буферных растворов при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. После калибровки электрод промывали дистиллированной водой и просушивали между измерениями.

Измерения pH проводили непосредственно в стеклянных банках объемом 1 л и рабочих колбах в процессе смешивания компонентов.

Буферную емкость среды определяли в процессе доведения pH до целевых значений для различных модулей установки иЖКТ. Измерения проводили непосредственно в стеклянных банках объемом 1 л.

Для модулей I и II (тонкий и толстый кишечник) при необходимости использовали 0,1 М раствор NaCl и NaOH для достижения pH 6,8–7,2 и 6,5–6,8 соответственно.

2.1.5. Апробация в эксперименте искусственной кишечной среды

Для апробации ИКС свиньи в экспериментальных условиях было проведено исследование по культивированию в ней естественной кишечной микробиоты свиньи *in vitro* с последующим изучением ее свойств и сравнением с данными нативного материала.

Стерильность среды после автоклавирования подтверждали бактериологическим контролем в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности». Образцы хранились при двух температурных режимах, часть в холодильнике при 4°C 72 часа, другая часть в

термостате при 35°C в течение того же времени. Это позволило оценить поведение среды при разных условиях хранения.

Бактериологический посев выполняли в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Перед началом работы на дне чашек Петри маркировали тип среды и номер исследуемого образца. Бактериологическую петлю стерилизовали над пламенем спиртовки, края пробирки с образцом прокаливали, после чего петлю охлаждали о внутреннюю стенку пробирки и переносили исследуемый материал на поверхность питательной среды, равномерно распределяя по секторам.

Для контрольного культивирования использовали следующие селективные среды: молочно-растительную среду – для выявления бифидобактерий, энтерококковый агар – для детекции энтерококков, среду Эндо – для определения *E. coli* и лактозопозитивных бактерий, MRS-агар – для выделения *Lactobacillus spp.*

После нанесения посевного материала чашки Петри помещали в анаэроостат, где создавали бескислородную атмосферу газовой смесью, состоящей из 80% N₂, 10% H₂ и 10% CO₂, и поддерживали температуру 37°C в течение 72 часов.

2.1.6. Изучение микробиоты свиней *in vivo*

2.1.6.1. Отбор проб кишечного содержимого свиней

Для моделирования микробиоты свиней в условиях *in vitro* с использованием установки иЖКТ были собраны образцы содержимого из тонкого и толстого отделов кишечника клинически здоровой свиньи в возрасте 29 недель и взрослых животных на предприятии “Вепоз”. Животное содержалось на свиноферме в Ростовской области, при этом антибиотикотерапия не применялась, а рацион кормления оставался неизменным в преддверии убоя. Использовался концентрированный влажный тип кормления.

Отбор проб осуществлялся в убойном цеху мясоперерабатывающего предприятия сразу после убоя свиньи. Материал собирали в стерильные

полимерные контейнеры методом выдавливания кишечного содержимого из просвета кишки с использованием стерильной ложки. Образец из тонкого отдела кишечника представлял собой композитную пробу, включающую содержимое двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишки. Образец из толстого отдела формировали путем объединения содержимого слепой, ободочной и прямой кишки.

Транспортировка проб в лабораторию занимала не более 2 часов. Образцы перевозили в изотермическом контейнере с хладагентами при температуре 8°C. По прибытии в лабораторию кишечное содержимое из обоих отделов ЖКТ подвергали механической гомогенизации и последующей фильтрации через стерильное сито с диаметром пор 500 мкм.

Из гомогенизированного материала производили аликвотирование для различных типов анализа: 1 мл - для культурального микробиологического исследования, 4 мл - для ПЦР-диагностики, 10 мл - для высокопроизводительного секвенирования, 2 мл - для хроматографического анализа и 30 мл - в качестве инокулята для загрузки в экспериментальную установку иЖКТ.

2.1.6.2. Микробиологическое исследование кишечного содержимого свиней

Исходный материал в виде подготовленных образцов содержимого тонкого и толстого отделов кишечника (согласно описанной выше методике в п.2.1.6.1.) использовали для микробиологического анализа с целью создания положительного контроля. Из каждого образца объемом 0,5 мл готовили последовательные десятикратные разведения в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-10} с использованием 4,5 мл стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl). Полученные разведения высевали в различных объемах на следующие питательные среды:

1. Агар Эндо - поверхностный посев 0,1 мл с распределением шпателем для выявления бактерий группы кишечной палочки (БГКП), культивирование в аэробных условиях при 37°C с оценкой результатов через 24 часов;

2. Энтерококкагар - поверхностный посев 0,1 мл шпателем для детекции энтерококков, инкубация в атмосфере воздуха при 37°C с учетом результатов через 24 часа;
3. Среда Вильсон-Блэра - глубинный посев 1 мл в расплавленную среду для определения сульфитредуцирующих клостридий, инкубация в аэробных условиях при 37°C с оценкой через 48 часов;
4. MRS-агар - поверхностный посев 0,1 мл шпателем для выделения лактобактерий, культивирование в анаэроостате при 37°C с учетом результатов через 48-72 часов;
5. Бифидум-агар - глубинный посев 1 мл в расплавленную среду для детекции бифидобактерий, инкубация в атмосфере воздуха при 37°C с оценкой через 48-72 часа;
6. LB-агар - посев методом смешивания 1 мл образца с расплавленной средой в чашке Петри для определения общего микробного числа (ОМЧ), инкубация в аэробных условиях при 37°C с учетом результатов через 24 часа;
7. Тиогликолевая среда - глубинный посев 1 мл для выявления анаэробных микроорганизмов, инкубация в атмосфере воздуха при 37°C с оценкой через 48 часов.

Процедура посева осуществлялась в соответствии с требованиями ГОСТ 26669-85 (подготовка проб к микробиологическим анализам), и ГОСТ 26670-91 (методы культивирования микроорганизмов и обработка результатов), которые применялись в качестве методической основы с адаптацией к специфике анализа кишечного содержимого.

Перед инокуляцией чашки с агаризованными средами подвергали подсушиванию в ламинарном потоке микробиологического бокса безопасности в течение 1 часа для устранения конденсата с поверхности. На высушенную поверхность агара наносили требуемый объем из соответствующего разведения и незамедлительно распределяли инокулом равномерным слоем с помощью стерильного шпателя.

Для селективного выявления и количественного определения отдельных таксономических групп микроорганизмов использовали оптимальный диапазон 15-150 колоний специфической группы (например, колиформных бактерий) на одну чашку.

При культивировании бифидобактерий и клостридий применяли технику внесения 1,0 мл разведения в пробирки, содержащие 9 мл среды «Бифидум» и «Среда Вильсон-Блэра» соответственно.

Инкубацию данных посевов проводили при температуре +37°C с последующей оценкой результатов в интервале 24-72 часа, что соответствует общему режиму термостатирования, применяемому для плотных питательных сред в данном исследовании.

Все посеvy на плотные питательные среды инкубировали при +37 °C, а учет роста выполняли в течение 24-72 часов, что позволяет регистрировать как быстрорастущие, так и более медленно формирующиеся колонии целевых групп.

При оценке общего числа жизнеспособных микроорганизмов на неселективных средах учитывали все выросшие колонии, а при работе с селективными/диагностическими средами учитывали колонии, характерные по морфологии и (при наличии индикаторов) по типичной цветной реакции, что прямо сформулировано в ГОСТ 26670-91 как правило подсчета для разных типов сред.

При посевах на Эндо-агар, Энтерококкагар и Лактобакагар учитывали морфологически характерные колонии целевых групп (соответственно *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*) и выполняли количественный учет по КОЕ с последующим расчетом содержания микроорганизмов в исходной пробе.

Подсчет колоний осуществляли визуально невооруженным глазом или с применением оптических приборов/счетчика колоний при необходимости.

В случаях наблюдения слияния колоний (конфлюэнтный рост), выраженного растекания инокулюма или неравномерного распределения материала по поверхности, такую чашку исключали из анализа и использовали следующее разведение.

Концентрацию микроорганизмов в исходном образце выражали в колониеобразующих единицах на миллилитр (КОЕ/мл).

Для отображения динамики количественных показателей в модулях «тонкая кишка» и «толстая кишка» результаты анализировали на протяжении 21 суток эксперимента.

Определение исходной концентрации микроорганизмов проводили на основе подсчитанного количества колоний (N) на чашке или в толще столбика среды в пробирке с учетом степени разведения (10^{-k}) и объема посева (0,1 мл или 1 мл).

Формула расчета при посеве 0,1 мл:

$$\text{КОЕ/мл} = N \times 10^{-k} \times 10.$$

Формула расчета при посеве 1 мл:

$$\text{КОЕ/мл} = N \times 10^{-k}.$$

2.1.6.3. Исследование проб методом ПЦР-РВ нативных образцов

Образцы нативного материала массой 1-3 г (или объемом 1-3 мл) собирали в стерильные пластиковые контейнеры. Для обеспечения корректной количественной оценки состава кишечной микробиоты при выделении ДНК использовали строго фиксированное количество биоматериала – 0,1 г, которое определяли взвешиванием перед процедурой экстракции. Критерием адекватности отбора материала и качественного проведения экстракции ДНК служил показатель общей бактериальной массы не ниже 10^5 КОЕ/мл. Использование избыточного количества материала для выделения ДНК могло приводить к ингибированию ПЦР-реакции и, как следствие, к искажению результатов анализа.

Для пролонгированного хранения материала готовили фекальную суспензию с добавлением глицерина, которую хранили в морозильной камере при температуре не выше минус 18°C не более 1 месяца или при минус 70°C длительно. Повторное замораживание и размораживание образцов не допускалось.

Экстракцию ДНК осуществляли из жидкого материала, в связи с чем для выделения ДНК использовали содержимое установки иЖКТ и фекальную

суспензию из нативного материала тонкого и толстого отделов кишечника свиней набором ДНК-сорб-В (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Для приготовления фекальной суспензии в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл вносили по 0,8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Затем в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером (или одноразовыми лопатками) вносили по 0,1 г фекалий и тщательно ресуспендировали на вортексе до формирования гомогенной суспензии. Для выделения ДНК из кишечных проб использовали лизирующий раствор, сорбент и последовательную систему отмывки. Перед началом работы лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 при хранении в условиях 2–8 °С прогревали до полного растворения кристаллов при 65 °С. В одноразовые пробирки вносили по 10 мкл внутреннего контрольного образца, при его наличии, и по 300 мкл лизирующего раствора. Затем добавляли по 100 мкл исследуемой пробы, а в пробирки отрицательного и положительного контролей – соответствующие контрольные образцы. После перемешивания пробы прогревали 5 мин при 65 °С и кратко центрифугировали.

Далее в каждую пробирку вносили 25 мкл тщательно ресуспендированного универсального сорбента, перемешивали и осаждали его центрифугированием. Надосадочную жидкость удаляли, после чего выполняли двухэтапную отмывку: сначала 300 мкл раствора для отмывки 1, затем 500 мкл раствора для отмывки 2 с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. После этого пробирки подсушивали при 65 °С в течение 5–10 мин с открытыми крышками.

Для элюции ДНК вносили 50 мкл ТЕ-буфера, пробы перемешивали и инкубировали 5 мин при 65 °С с периодическим встряхиванием. Завершающее центрифугирование при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин обеспечивало получение очищенной ДНК, пригодной для постановки ПЦР.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к полученной фекальной суспензии добавляли глицерин до конечной концентрации 10-15%. Смесь тщательно

гомогенизировали на вортексе и после 30-40-минутной экспозиции с глицерином замораживали.

Непосредственно перед процедурой выделения ДНК готовили бактериальную фракцию фекалий. Для этого пробирки с фекальной суспензией центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 30 секунд. Для выделения ДНК использовали верхнюю фракцию (супернатант). Фекальную суспензию, хранившуюся в замороженном состоянии, перед центрифугированием выдерживали при комнатной температуре до полного размораживания.

Флуоресцентную детекцию продуктов амплификации осуществляли в режиме реального времени с использованием детектирующего амплификатора ДТ-прайм в соответствии с инструкцией к набору «Колонофлор-16 (биоценоз)». ПЦР-амплификацию проводили в реакционной смеси общим объемом 35 мкл, из которых 5 мкл приходилось на исследуемую ДНК. Для постановки реакции в штатив устанавливали необходимое число стрипов с амплификационной смесью с учетом количества анализируемых образцов и контролей. В каждую пробирку вносили по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы, затем добавляли по капле минерального масла и закрывали крышки. Для снижения риска контаминации пробирки открывали поочередно только непосредственно перед внесением соответствующего образца. В стрипы для отрицательного контроля вносили по 5 мкл отрицательного контрольного образца, в рабочие пробирки – по 5 мкл каждой исследуемой ДНК-пробы, а в стрипы для положительного контроля – по 5 мкл соответствующих положительных контрольных образцов в зависимости от используемой формы набора. После внесения компонентов все стрипы устанавливали в блок детектирующего амплификатора строго вертикально, соблюдая установленный порядок размещения пробирок.

Расчет результатов проводили по пороговому (Ct) методу. Отчет о постановке в формате *.rtf использовали для количественной обработки полученных данных, пересчета значений Ct в КОЕ/мл для каждого микроорганизма (или группы микроорганизмов) и формирования заключения с применением программного обеспечения, поставляемого в комплекте с набором «Колонофлор».

Обработку данных и формирование заключения осуществляли согласно руководству пользователя данной программы.

2.1.6.4. Биохимическое исследование кишечного содержимого свиней

Пробы получали из содержимого двенадцатиперстной кишки, тонкого и толстого кишечника, а также прямой кишки, согласно описанной выше методике в п.2.1.6.1. Для бактериологического анализа образцы асептически извлекали из пробирок для последующей экстракции путем измельчения в стерильно фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в соотношении 1:10. Затем экстракты были изучены качественно-количественным методом с использованием дифференциально-диагностических твердых питательных сред. Выбор колоний для дальнейших исследований осуществляли на основании морфологии колоний и микроскопии с Окраской по Граму. Профили изолированных микроорганизмов определяли с применением масс-спектрометрии MALDI-TOF (Чеботарь И.В. с соавт., 2018) на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics) с использованием программного обеспечения FlexControl. Обработку и визуализацию спектров выполняли в программе FlexAnalysis 3.3. Видовую идентификацию бактерий осуществляли с использованием базы данных «MALDI Biotyper Realtime Classification».

Интерпретацию результатов идентификации проводили на основании балльных критериев, указанных в инструкции к прибору: значения 2,300-3,000 соответствовали высокой вероятности видовой идентификации; 2,000-2,299 – надежной идентификации рода с вероятной видовой идентификацией; 1,700-1,999 – вероятной идентификации рода; 0,00-1,699 – ненадежной идентификации.

Получение масс-спектрометрических профилей микроорганизмов осуществляли с использованием системы Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) с программным обеспечением FlexControl. Визуализацию и обработку данных проводили в программной среде Flex Analysis 3.3. Идентификацию бактериальных видов выполняли с применением настольного масс-спектрометра

Microflex с базой данных «MALDI Biotyper Realtime Classification» и программного обеспечения «FlexControl».

Подготовку образцов для анализа чистых культур осуществляли согласно протоколу производителя. Суточные чистые культуры бактерий в виде изолированных колоний наносили тонким слоем непосредственно на целевую позицию мишени, начиная от центра. Целевые позиции покрывали 1 мкл матричного раствора НССА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) и высушивали при комнатной температуре до полного испарения растворителя. После высыхания мишень с образцами помещали в камеру масс-спектрометра. Уровень достоверности идентификации бактерий определяли по балльным критериям, регламентированным в инструкции производителя.

2.1.6.5. Определение метагеномных профилей сообществ микроорганизмов из нативного материала свиньи

Образцы кишечного содержимого были отобраны из различных отделов ЖКТ, выполнено выделение метагеномной ДНК, а также проведены секвенирование и последующий биоинформатический анализ полученных данных.

В рамках работы было исследовано 56 образцов, полученных от 14 взрослых свиней. Отбор осуществлялся из следующих отделов желудочно-кишечного тракта: двенадцатиперстная кишка, тонкий кишечник, толстый кишечник и прямая кишка. Все образцы отбирались в убойном цехе мясоперерабатывающего предприятия непосредственно после забоя животных с использованием стерильных полимерных контейнеров и стерильного инструментария. Транспортировка проб в лабораторию осуществлялась в течение 2 часов при температуре 8 °С.

Выделение ДНК из отобранных проб проводили с использованием коммерческого набора SKY Amp Genomic DNA Kit, EDC304 (SkyGen, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Навеску исследуемого материала ресуспендировали в 200 мкл буфера ГА, при необходимости в образец добавляли

РНКазу А для удаления сопутствующей РНК. Затем вносили 20 мкл протеиназы К и инкубировали при 56 °С до полного лизиса клеток, после чего добавляли 200 мкл буфера ГБ и дополнительно инкубировали при 70 °С в течение 10 мин для получения гомогенного лизата. Для связывания ДНК с кремниевой мембраной к образцу добавляли 200 мкл этанола (96–100%), тщательно перемешивали и переносили смесь на колонку СБЗ с последующим центрифугированием при 12 000 об/мин. Мембрану последовательно промывали буферами ГД и ПВ, содержащими этанол, с повторными циклами центрифугирования для удаления примесей и остаточного лизата. После окончательной сушки мембраны ДНК элюировали нанесением 50–200 мкл буфера ТЕ в центр мембраны с последующей инкубацией при комнатной температуре и центрифугированием для сбора очищенного элюата. Полученные растворы нуклеиновых кислот хранили при температуре –20 °С до направления на секвенирование. Чистоту ДНК оценивали по соотношению A260/A280 ($\geq 1,7$), а концентрацию определяли с использованием флуориметра Qubit 4 (ThermoFS, США) и набора Equalbit 1x dsDNA HS Assay kit (Vazyme, Китай).

Подготовка библиотек метагеномной ДНК проводилась в рамках договора с ООО «Альгавитапро» с использованием набора SMRTbell Prep Kit 3.0 (PacBio, США). Секвенирование выполняли на платформе PacBio Sequel IIe. В результате были получены данные в формате FASTQ.

Демультимплексирование прочтений выполнялось с использованием программы PacBio lima (версия 2.5.1). HiFi-чтения (CCS, точность $\geq Q20$) извлекались с помощью SAMtools (версия 1.13) (Daneseck P. et al., 2021) и конвертировались в формат FASTQ с использованием PacBio bam2fastq (версия 1.3.1). Удаление праймерных последовательностей проводилось с помощью cutadapt (версия 4.2) (Martin M, 2011). Фильтрация и обработка ридов, включая удаление низкокачественных последовательностей, денуазирование, коррекцию ошибок и удаление химер, осуществлялись с использованием пакета DADA2 (Callahan B.J. et al., 2016) в среде R.

Полученные последовательности сопоставлялись с пользовательской базой

данных, сформированной на основе SILVA версии 138 nr99 (Quast C. et al, 2012), с применением алгоритма MINIMAP2 (Li H., 2018). Таксономическая аннотация проводилась методом наименьшего общего предка (LCA), реализованным в MEGAN6 Ultimate Edition (версия 6.18.7) (Huson D.H. et al, 2016).

В дальнейший анализ включались только таксоны с относительным обилием более 0,01 %. Расчет относительного обилия, индексов разнообразия и метрики Брея–Кертиса выполнялся в среде R (версия 4.0.4). Контроль качества файлов FASTQ осуществлялся с использованием FastQC (версия 0.11.5-cegat), а визуализация результатов – с помощью пакета ggplot2 (Wickham H., 2009) в R.

2.1.7. Моделирование микробиоты свиней *in vitro*

2.1.7.1. Запуск иЖКТ

На протяжении 21 дня эксперимента из каждого модуля установки иЖКТ ежедневно в фиксированное время производили отбор 17 мл культуральной среды для проведения различных типов анализа. Отбор образцов совмещали с процедурой внесения свежей питательной среды («кормления») с целью поддержания постоянного рабочего объема реакционной смеси.

Из каждой пробы осуществляли аликвотирование материала для различных методов исследования: 1 мл – для культурального микробиологического анализа, 4 мл – для ПЦР, 10 мл – для высокопроизводительного секвенирования, 2 мл – для хроматографического исследования. Аликвоты, предназначенные для ПЦР, секвенирования и хроматографии, немедленно замораживали и хранили при температуре минус 80°C до момента проведения соответствующих анализов. Образцы для микробиологического исследования использовали непосредственно после отбора без предварительного хранения (*ex tempore*).

Уровень pH в биореакторах поддерживали автоматически по принципу обратной связи и регулировали в диапазоне 6,8–7,2 для тонкокишечного модуля и 6,5–6,8 для толстокишечного модуля путем дозированного введения 1 М растворов HCl и NaOH с использованием инфузионной системы. Все модули собирали

асептически в боксе микробиологической безопасности с ламинарным потоком и объединяли в единую установку.

В тонкокишечный модуль объемом 700 мл непрерывно подавали свежую стерильную универсальную среду со скоростью 1,5 мл/ч, с той же скоростью содержимое модуля поступало в толстокишечный биореактор, из которого аналогичный объем среды непрерывно отводился в емкость с дезинфицирующим раствором. Два раза в сутки с интервалом 12 часов моделировали прием пищи: в тонкокишечный модуль одномоментно вносили 33 мл свежей стерильной среды, после 5 минут перемешивания и коррекции pH такой же объем переносили в модуль толстой кишки, из которого 33 мл среды удаляли в дезраствор.

После стабилизации всех параметров в биореакторы вносили образцы от свиней. Материал представлял собой асептически отобранные при убое средние порции содержимого тонкого и толстого кишечника объемом 31 мл, доставленные в лабораторию в течение не более 2 часов при температуре 4 °С. Из каждой пробы 1 мл использовали для микробиологического анализа, оставшиеся 30 мл вносили в соответствующий биореактор.

Из каждого модуля биореакторной системы ежедневно в одно и то же время отбирали по 17 мл среды для дальнейших исследований, отбор совмещали с этапом «кормления» для сохранения объема реакционной смеси. Микробиологический анализ отобранных проб выполняли аналогично анализу нативного материала.

2.1.7.2. Микробиологическое исследование проб из иЖКТ

Подготовка образцов и метод микробиологического контроля проводился по методике, описанной в пункте 2.1.6.2.

Динамику микробиологических показателей в обоих модулях анализировали на протяжении 21 суток эксперимента.

Другие изоляты идентифицировали масс-спектрометрией MALDI-TOF MS (прибор Microflex LT; ПО FlexControl; база данных MALDI Biotyper; визуализация Flex Analysis 3.3) на основе суточных изолированных культур.

2.1.7.3. Биохимическое исследование проб из иЖКТ

Видовую идентификацию бактериальных изолятов проводили методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS с использованием настольного масс-спектрометра Microflex, оснащенного базой данных MALDI Biotyper, описанной в пункте 2.1.6.4.

2.1.7.4. Исследование проб методом ПЦР-РВ из иЖКТ

Подготовка образцов и метод ПЦР-РВ проводили по методике, описанной в пункте 2.1.6.5. При использовании содержимого установки иЖКТ в стерильные пробирки отбирали по 0,1 мл образца и центрифугировали при 10 000-13 000 об/мин в течение 30 секунд. Для выделения ДНК использовали супернатант.

Флуоресцентную детекцию продуктов амплификации осуществляли в режиме реального времени с использованием детектирующего амплификатора ДТ-прайм в соответствии с инструкцией к набору «Колонофлор-16 (биоценоз)». Обработку данных и формирование заключения осуществляли согласно руководству пользователя данной программы.

2.1.7.5. Фенотипическое определение антибиотикочувствительности

Оценку антибиотикорезистентности выделенных культур проводили методом диффузии в агар с применением дисков согласно МУК 4.2.1890-04. В качестве питательной основы применяли агар Мюллера-Хинтон, приготовленный по инструкции производителя, с толщиной слоя ($4,0 \pm 0,5$) мм для обеспечения корректной диффузии антимикробных препаратов и стандартизации диаметров зон подавления роста.

Тестирование осуществляли в чашках Петри диаметром 90 мм. Перед началом работы чашки выдерживали при комнатной температуре для предотвращения

образования конденсата на поверхности среды, поскольку избыточная влага может исказить результаты теста.

Бактериальную суспензию для посева готовили из 24-часовой культуры исследуемого штамма. Инокулюм готовили из суточной чистой культуры исследуемого микроорганизма: микробную массу суспендировали в стерильном изотоническом растворе или бульоне и доводили плотность суспензии до 0,5 по стандарту МакФарланда (примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Для инокуляции применяли стерильный ватный тампон: тампон погружали в стандартную суспензию микроорганизма, затем удаляли избыток инокулюма, отжимая тампон о стенку пробирки. Посев выполняли штриховыми движениями по всей поверхности агара в трех направлениях, каждый раз поворачивая чашку Петри приблизительно на 60 градусов, чтобы сформировать равномерный «газон» роста. После инокуляции чашку оставляли при комнатной температуре на 3-5 минут (допустимо до 10-15 минут, но не более) для абсорбции инокулюма поверхностью среды.

Аппликацию дисков с антибактериальными препаратами проводили не позднее чем через 15 минут после инокуляции, используя стерильный пинцет или диспенсер. Диски размещали так, чтобы обеспечить стандартные расстояния: от диска до края чашки и между дисками – 15-20 мм, после чего диски аккуратно прижимали пинцетом для полного и равномерного контакта с поверхностью агара.

После нанесения дисков чашки немедленно помещали в термостат и инкубировали (как правило, в перевернутом положении) при 37°C в течение 1-20 часов. По окончании инкубации измеряли диаметры зон задержки роста в миллиметрах по наиболее четкой границе отсутствия видимого роста и интерпретировали результаты в соответствии с референсными критериями, приведенными в МУК 4.2.1890 04.

Чувствительность изолятов *Escherichia coli* определяли к 11 препаратам: амоксициллин/клавулановая кислота 20/10 мкг, цефтазидим 30 мкг, цефотаксим 30 мкг, цефтриаксон 30 мкг, ампициллин 10 мкг, имипенем 10 мкг, доксициклин 30 мкг, офлоксацин 5 мкг, гентамицин 10 мкг, левомицетин 30 мкг, тетрациклин 30 мкг. Для изолятов *Enterococcus spp.* определяли чувствительность к 9 препаратам:

амоксациллина/клавулановой кислоте 20/10 мкг, бензилпенициллина 10 мкг, ампициллина 10 мкг, доксициклина 30 мкг, ванкомицина 30 мкг, гентамицина 120 мкг, левомицетина 30 мкг, эритромицина 15 мкг и тетрациклина 30 мкг.

Для каждого теста фиксировали диаметры зон ингибирования роста и условия постановки эксперимента для обеспечения воспроизводимости результатов.

2.1.8. Моделирование дисбиоза на фоне антибиотикотерапии *in vitro*

2.1.8.1. Отбор проб свиньи

Для *in vitro* моделирования кишечной микробиоты свиней в системе иЖКТ отбирали содержимое толстого отделов кишечника клинически здоровой свиньи 29-недельного возраста и взрослых животных, выращенных на ферме Ростовской области “Вепоз” без применения антибиотикотерапии и без смены рациона перед убоем. Отбор проводили в убойном цеху мясоперерабатывающего предприятия непосредственно после забоя: кишечное содержимое выдавливали из просвета кишки стерильной ложкой в стерильные полимерные контейнеры.

Пробу из толстого отдела получали объединением содержимого слепой, ободочной и прямой кишки. Транспортировка в лабораторию занимала не более 2 часов и осуществлялась в изотермическом контейнере с хладагентами при температуре около 4 °С. По прибытии пробы механически гомогенизировали и фильтровали через стерильное сито с размером пор 500 мкм.

Из полученного гомогенизированного материала отбирали аликвоты под разные виды анализа: 1 мл – для культурального микробиологического исследования, 4 мл – для ПЦР-диагностики и 50 мл – как инокулят для загрузки в экспериментальную установку иЖКТ.

2.1.8.2. Запуск иЖКТ

Все модули установки асептически монтировали в боксе микробиологической безопасности 2А-класса и объединяли в единую систему.

Рабочий объем толстокишечного модуля составлял 450 мл. Кишечная среда, используемая в иЖКТ описана в пункте 2.1.3. На протяжении 9 дней эксперимента каждые 24 часа, после отбора 5 мл пробы из биореактора, из него удаляли 100 мл содержимого и заменяли эквивалентным объемом свежей кишечной среды, имитируя регулярное кормление.

В первый день опыта после стабилизации режимных параметров в биореактор вносили пробы кишечного содержимого свиньи – средние порции толстого отдела (50 мл), асептически отобранные при забое и доставленные в лабораторию не позднее 2 часов при 4 °С. Из каждой пробы отбирали аликвоты для последующих исследований: 1 мл – для культурального анализа, 4 мл – для ПЦР. Образцы, предназначенные для ПЦР, немедленно замораживали и хранили при минус 80 °С до выполнения соответствующих методик, тогда как материалы для микробиологического посева использовали непосредственно после отбора (*ex tempore*).

Уровень pH в биореакторах поддерживали в автоматическом режиме по принципу обратной связи: в толстокишечном – 6,5–6,8, с помощью дозированного введения 1 М растворов HCl и NaOH через инфузионную систему.

2.1.8.3. Алгоритм внесения проб и препаратов в биореактор

Перед внесением кишечных проб свиньи в биореактор проводили микробиологический анализ проб. Затем пробы вносили в биореактор, имитирующий толстый отдел кишечника. На третьи сутки была проведена оценка формирования устойчивого микробиоценоза, соответствующего нативным образцам. При отсутствии контаминации переходили к этапу внесения антимикробного препарата.

Для внесения препарата Амоксигард в необходимой концентрации – 16 мг/л, необходимо было приготовить раствор. Для этого 1 мл препарата, который содержит 140 мг/мл разводили в 9 мл физраствора, затем перемешивали на вортексе, избегая образования пены. Итоговая концентрация промежуточного

раствора составляла 14 мг/мл. Из него отбирали 514 мкл и добавляли к 450 мл кишечной среды с последующим перемешиванием до однородности, что обеспечивало конечную концентрацию амоксициллина 16 мг/л, соответствующую удвоенной минимальной подавляющей концентрации для чувствительных изолятов.

По завершении курса антибиотика в течение двух дней инициировали фазу пробиотической коррекции препаратом Ветоспорин Ж, содержащим *Bacillus subtilis* в дозировке 10 мл на 1 л среды, что соответствует терапевтическому режиму при дисбиозе. Перед введением препарат проверяли на чистоту и соответствие заявленному титру: готовили серию десятикратных разведений, высевали каждое на ГРМ-агар и инкубировали 24 часа. По завершении инкубации подтверждали рост бактерий заявленного вида без примеси посторонней микрофлоры, концентрация жизнеспособных клеток соответствовала паспортным данным (не менее 10^8 КОЕ/мл) и фактически составляла 10^9 КОЕ/мл.

2.1.8.4. Микробиологическое исследование проб из нативного материала и иЖКТ

Для микробиологического контроля из модулей, моделирующих тонкий и толстый отделы кишечника, ежедневно отбирали пробы. Каждый образец объемом 1 мл подвергали серийным десятикратным разведениям от 10^{-1} до 10^{-12} в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия (по 9 мл). Разведенные образцы высевали на специализированные питательные среды в следующих режимах:

1. Агар Эндо – поверхностный посев 0,1 мл с распределением шпателем для выявления бактерий группы кишечной палочки (БГКП), культивирование в аэробных условиях при 37°C с оценкой результатов через 24 часов;
2. Энтерококкагар – поверхностный посев 0,1 мл шпателем для детекции энтерококков, инкубация в атмосфере воздуха при 37°C с учетом результатов через 24 часа;

3. Среда Вильсон-Блэра – глубинный посев 1 мл в расплавленную среду для определения сульфитредуцирующих клостридий, инкубация в аэробных условиях при 37°C с оценкой через 48 часов;
 4. MRS-агар – поверхностный посев 0,1 мл шпателем для выделения лактобактерий, культивирование в анаэроостате при 37°C с учетом результатов через 48-72 часов;
 5. Бифидум-агар – глубинный посев 1 мл в расплавленную среду для детекции бифидобактерий, инкубация в атмосфере воздуха при 37°C с оценкой через 48-72 часа;
 6. Тиогликолевая среда – глубинный посев 1 мл для выявления анаэробных микроорганизмов, инкубация в атмосфере воздуха при 37°C с оценкой через 48 часов.
 7. ГРМ-агар – посев методом смешивания 1 мл образца с расплавленной средой в чашке Петри для определения общего микробного числа (ОМЧ), инкубация в аэробных условиях при 37°C с учетом результатов через 24 часа;
- Методика выполнялась согласно описанной в пункте 2.1.6.2.

2.1.8.5. Исследование проб методом ПЦР-РВ из нативного материала и иЖКТ

Подготовка образцов и метод ПЦР в реальном времени проводили по методике, описанной в пункте 2.1.6.5. Образцы проб нативного материала и из иЖКТ массой 1–3 г (или объемом 1–3 мл) отбирали в стерильные пластиковые контейнеры. Для стандартизации количественной оценки кишечной микробиоты при выделении ДНК использовали строго фиксированный объем биоматериала: 0,1 г, предварительно отмеряемый на весах перед экстракцией. Показателем корректности отбора и качества процедуры выделения ДНК считали значение общей бактериальной массы не ниже 10^5 КОЕ/мл.

2.1.9. Статистическая обработка полученных результатов

Первичную обработку данных, формирование электронных таблиц, расчет описательных статистических показателей и подготовку графических материалов проводили выполняли в MS Excel (США, 2015). В Microsoft Excel определяли среднее арифметическое значение, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего, медиану, минимальное и максимальное значения, квартильные характеристики и коэффициент вариации. Для расчета указанных показателей использовали встроенные функции СРЗНАЧ, СТАНДОТКЛОН.В, СТАНДОТКЛОН.Г, СТОШУХ, МЕДИАНА, МИН, МАКС, КВАРТИЛЬ.ВКЛ, СЧЕТ, а также инструменты описательной статистики надстройки «Анализ данных».

Статистический анализ проводили с использованием языка программирования R версии 4.2.3 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Для проверки достижения устойчивого микробиологического равновесия в системе иЖКТ провели статистическую оценку сопоставления количественных показателей микробиоты. Сравнение проводили между результатами культурального метода нативных проб и из иЖКТ. Для каждого таксона (ОМЧ, облигатные анаэробы, лактобациллы, бифидобактерии, энтерококки, клостридии, БГКП) формировались парные наблюдения. Значение показателя в конкретные сутки периода стабилизации сопоставлялось с соответствующим значением нативного контроля. Сравнение проводили с использованием критерия Уилкоксона для парных (связанных) наблюдений, поскольку данные представляли собой повторные измерения одного и того же показателя относительно фиксированной контрольной точки, а не независимые группы. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Для оценки связи между количественными показателями микробиоты нативного кишечного материала и соответствующих модулей системы иЖКТ, полученные методом ПЦР, использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. В анализ включали общую бактериальную массу и содержание

Lactobacillus spp., *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Bacteroides spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Enterococcus spp.* Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Для изучения динамики микробиологических показателей при антибиотико-ассоциированном дисбиозе использовали критерий Манна-Уитни. Суточные наблюдения были разделены на 3 группы: исходный уровень (1-4 сутки), уровень после введения антибиотика (5-7 сутки), уровень после применения пробиотика (8-9 сутки). Для каждой группы рассчитали медиану (Me) показателя в lg КОЕ/мл. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В диссертации представлены результаты научных исследований, опубликованные в научных статьях: Шебеко С. К., Тихменева (Ярушникова) Ю. А., Ермаков А. М. (2024); Шебеко С. К., Тихменева (Ярушникова) Ю. А., Сандулян К. В., Ермаков А. М. (2024); Ю. А. Тихменева (Ярушникова), С. К. Шебеко, С. Н. Головин, Г. Ю. Дробот, А. М. Ермаков (2025); Тихменева (Ярушникова) Ю.А., Шебеко С.К., Пименова Н.В., Тресницкий С.Н. (2026); Тихменева (Ярушникова) Ю.А., Головин С.Н., Седова Д.А., Ханукаев М.М., Дробот Г.Ю., Алешукина А.В., Шебеко С.К. (2026); Тихменева (Ярушникова) Ю.А., Попов И. В., Ермаков А.М. (2026); . Ярушникова Ю.А., Головин С. Н., Седова Д. А., Ханукаев М. М., Шебеко С. К., Тресницкий С. Н., Манжурина О.А., Михайлов Е.В. (2026).

3.1. Изучение физико-химических свойств кишечного содержимого свиней

3.1.1. Изучение реологических свойств кишечного химуса

Измерение вязкости различных вариантов искусственной кишечной среды выявило выраженную зависимость реологических характеристик от состава среды, степени ее разбавления и типа используемого шпинделя. Для всех исследованных образцов было характерно снижение вязкости при увеличении скорости вращения, что свидетельствует о псевдопластическом (shear-thinning) типе течения, типичном для слизистого содержимого ЖКТ.

При использовании шпинделя L4, предназначенного для измерения высоковязких жидкостей, полученные значения находились в диапазоне 7,7 до 14 976 мПа×с, что отражено в таблице 2. Для контрольного образца воды прибор регистрировал вязкость порядка 1,0 мПа×с, что подтверждает корректность калибровки вискозиметра. Вместе с тем при столь низких значениях вязкости измеряемый крутящий момент находился вблизи нижнего предела чувствительности прибора, в связи с чем данные для разбавленных образцов следует рассматривать как ориентировочные.

Таблица 2 - Измерение вязкости с использованием шпинделя L4 (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2025).

	Температура, t	Вязкость, мПа×с	Угол, %	Скорость вращения, об/мин
Тонкий отдел	19,8	14976	49,9	20
	19,8	11518	57,6	30
	19,8	8336,8	69,5	50
	19,8	7137,2	71,4	60
	19,8	4926,4	82,1	100
Тонкий отдел разбавленный	20,8	854	2	20
	20,8	411,4	2,1	30
	20,8	694,7	5,8	50
	20,8	556	5,6	60
	20,8	351,8	5,9	100
Толстый отдел	19,7	11935	39,8	20
	19,7	9009,4	45,1	30
	19,7	7030,6	58,6	50
	19,7	6108,2	61,1	60
	19,7	4603	76,7	100
Толстый отдел разбавленный	20,1	938,6	3,1	20
	20,1	475,2	2,4	30
	20,1	847,9	7,1	50
	20,1	667,2	6,7	60
	20,1	463,6	7,7	100

Результаты, полученные со шпинделем L4, преимущественно отражают поведение жидкой фазы среды и характеризуются нестабильной зависимостью вязкости от скорости вращения, обусловленной гидродинамическими эффектами при низких нагрузках. Результаты представлены на рисунке 2.

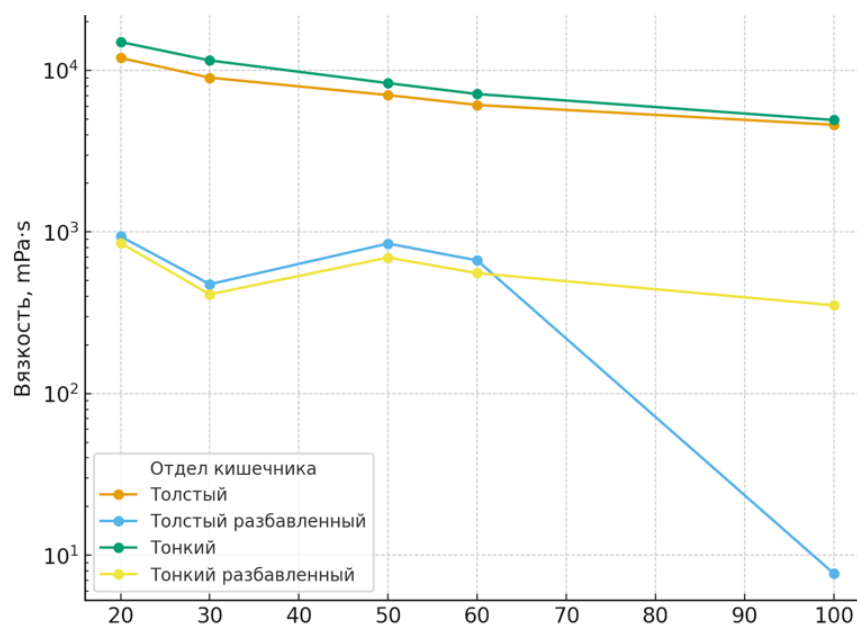


Рисунок 2 - Зависимость вязкости от скорости вращения (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2025).

Более воспроизводимые и физиологически релевантные данные были получены при использовании шпинделя L2, оптимизированного для сред средней вязкости. При температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ значения вязкости находились в диапазоне 200–900 мПа·с. Для разбавленной среды (500 мл унифицированной кишечной среды и 300 мл воды) вязкость тонкокишечного варианта составляла 667–217 мПа·с, а толстокишечного - 923–247 мПа·с, как показано в таблице 3. Оба варианта демонстрировали выраженное псевдопластическое поведение, при котором вязкость снижалась примерно в 3–4 раза с ростом скорости сдвига. Подобная динамика хорошо согласуется с литературными данными о реологических свойствах кишечной слизи свиней (Hung et al., 2022).

Таблица 3 - Измерение вязкости с использованием шпинделя L2 (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2025).

Отдел кишечника	Температура, t	Вязкость, мПа·с	Угол, %	Скорость вращения, об/мин
Тонкий отдел разбавленный	20,8	667,3	44,5	20
	20,8	513	51,3	30
	20,8	347,2	57,9	50

Окончание таблицы 3

Отдел кишечника	Температура, t	Вязкость, мПа×с	Угол, %	Скорость вращения, об/мин
Тонкий отдел разбавленный	20,8	300,3	60,1	60
	20,8	216,7	72,2	100
Толстый отдел разбавленный	20,1	922,6	61,5	20
	20,1	655,6	65,6	30
	20,1	444,8	74,2	50
	20,1	367	73,4	60
	20,1	246,8	82,3	100

Кривые вязкости, измеренные шпинделем L4 для тонкого и толстого отделов кишечника находятся в диапазоне физиологических значений, как показано на рисунке 3. При скорости вращения шпинделя 20-30 об/мин значения вязкости составляли 600-900 мПа×с, но при увеличении скорости вращения до 100 об/мин вязкость снижалась до 200-250 мПа×с. Это соответствует литературным данным о реологическом поведении слизистой фазы ЖКТ (Ellis P. R. et al., 1995). На рисунке 4 изображены данные, полученные при измерении вязкости шпинделем L2, также с диапазоном физиологических значений. Вязкость толстого отдела кишечника в обоих вариантах превышает вязкость тонкого отдела кишечника, так как содержит высокую концентрацию взвешенных частиц и муцин, как и в физиологических условиях.

При сравнении полученных данных с литературными источниками выяснилось, что разбавленная среда в соотношении 500 мл среды и 300 мл воды показывает реологические характеристики близкие к физиологическому содержимому кишечника. Следует отметить, что измерения в эксперименте проводились при температуре 20 °С, а в условиях *in vivo* поддерживается температура 37 °С. Из-за охлаждения вязкость снижается на 20-30 %, что дополнительно указывает на сходство полученных значений с физиологическим диапазоном. Использование разбавленной кишечной среды обеспечивает

оптимальную текучесть и вязкость, для циркуляции химуса и сохранения полимерно-слизистой компоненты.

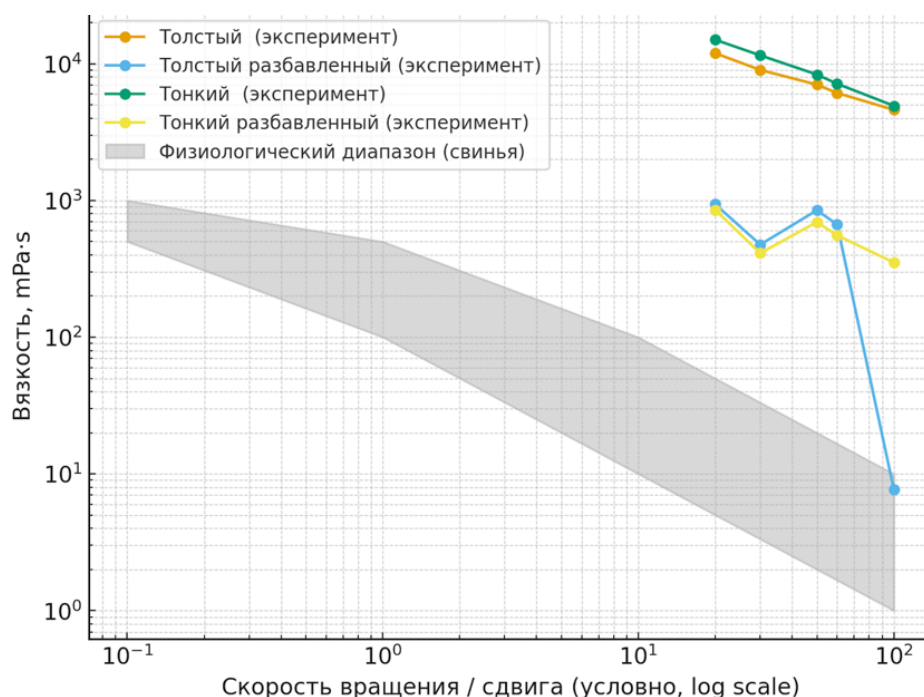


Рисунок 3 - Сравнение вязкости кишечной среды с физиологическими параметрами свиньи при использовании шпинделя L4 (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2025).

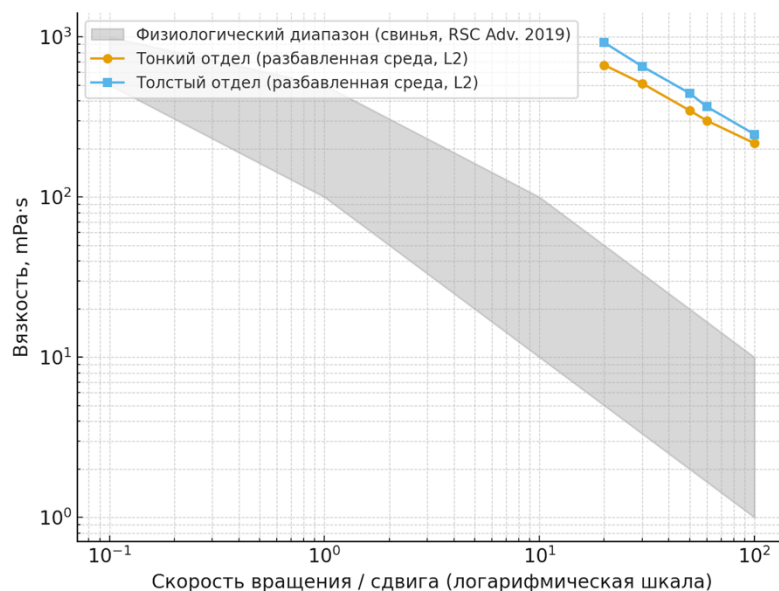


Рисунок 4 - Сравнение вязкости разбавленной кишечной среды с физиологическими параметрами свиньи при использовании шпинделя L2 (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2025).

Результаты проведенного исследования подтвердили, что вязкость является важным параметром при моделировании условий ЖКТ *in vitro*. Реология влияет на микробную ферментацию, доступность субстратов и имитацию перистальтики. Для моделирования процессов пищеварения в системе иЖКТ требуется среда с вязкостью 10^2 – 10^3 мПа×с при низких скоростях сдвига и псевдопластическим поведением (Ellis P. R. et al., 1995).

Оптимизированный вариант разбавленной унифицированной кишечной среды соответствует этим требованиям и может быть использован в качестве базовой модели для дальнейших исследований, направленных на изучение влияния пищевых волокон, ферментных систем и биологически активных добавок на микробиоту, энергетический обмен и переваримость рационов у свиней.

3.1.2. Изучение pH искусственной кишечной среды

Результаты измерения pH кишечного содержимого различных отделов желудочно-кишечного тракта свиней, смоделированных *in vitro* представлены в таблице 4. Измерение pH кишечного содержимого свиней выявило существенные различия между отделами желудочно-кишечного тракта.

В тонком кишечнике наблюдалось защелачивание среды до pH $7,0 \pm 0,2$, обусловленное секрецией бикарбонатов поджелудочной железой и желчью. Данный сдвиг pH в слабощелочную зону является критически важным для оптимальной активности панкреатических ферментов.

Таблица 4 - Значения pH кишечного содержимого различных отделов ЖКТ свиней (n=6), М – среднее, SD – стандартное отклонение (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026)

№ образца	Тонкий кишечник	Толстый кишечник
1	6,8	6,5
2	6,9	6,6

Окончание таблицы 4

3	6,8	6,7
4	7,1	6,7
5	7,2	6,8
6	7,0	6,7
M	7,0	6,7
SD	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$
*p	0,505	0,473

* p Шапиро–Уилка - соответствие распределения данных нормальному $p > 0,05$.

Полученные значения pH кишечного содержимого соответствуют литературным данным о физиологических особенностях различных отделов желудочно-кишечного тракта свиней. В тонком кишечнике поддерживается слабощелочная реакция среды, что связано с поступлением бикарбонатов панкреатического сока и желчи. В толстом кишечнике pH, как правило, несколько ниже вследствие активности кишечной микробиоты и образования органических кислот в процессе ферментации непереваренных компонентов корма.

Полученные в диссертационной работе данные по физико-химическим параметрам содержимого желудочно-кишечного тракта животных сведены и интегрированы в специализированную базу данных «База данных физико-химических параметров содержимого ЖКТ животных (жвачных, моногастричных и птиц)», зарегистрированную в установленном порядке (Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2026622310 от 22.05.2026; заявитель – ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет»).

3.2. Исследование нативного кишечного содержимого методом определения метагеномных профилей сообществ микроорганизмов в отделах желудочно-кишечного тракта свиньи

Результаты метагеномного анализа нативного кишечного содержимого свиней отображены в виде гистограмм на рисунке 5.

Для оценки разнообразия образцов были рассчитаны два показателя: индекс Шеннона–Винера H' и равномерность E' (Рисунок 6). Индекс H' отражает, сколько видов присутствует в каждой выборке и как часто они встречаются. Его значение растет при увеличении числа видов и достигает максимума, когда все виды имеют одинаковую относительную частоту (например, каждый вид встречается по одному разу). Поэтому верхняя граница H' определяется только числом видов в сообществе и формально не фиксирована. В отличие от него, равномерность E' всегда лежит в пределах от 0 до 1: значения, близкие к 1, соответствуют примерно одинаковому обилию видов, а низкие значения указывают на сильные различия в численности между видами.

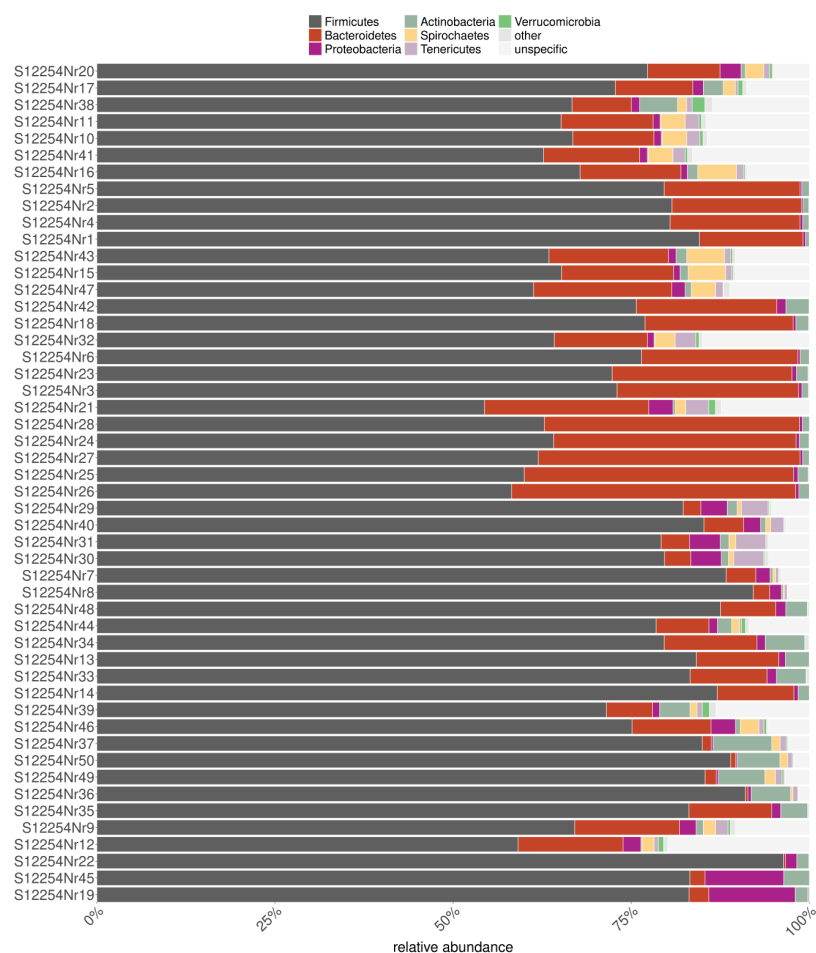


Рисунок 5 – Гистограммы относительного обилия филумов, присутствующих в каждом образце. Относительная численность была получена для всех филумов, присутствующих в каждом образце, и образцы были отсортированы по сходству Брея-Кертиса. Риды, отмеченные как неспецифические, не могут быть отнесены к одному филуму

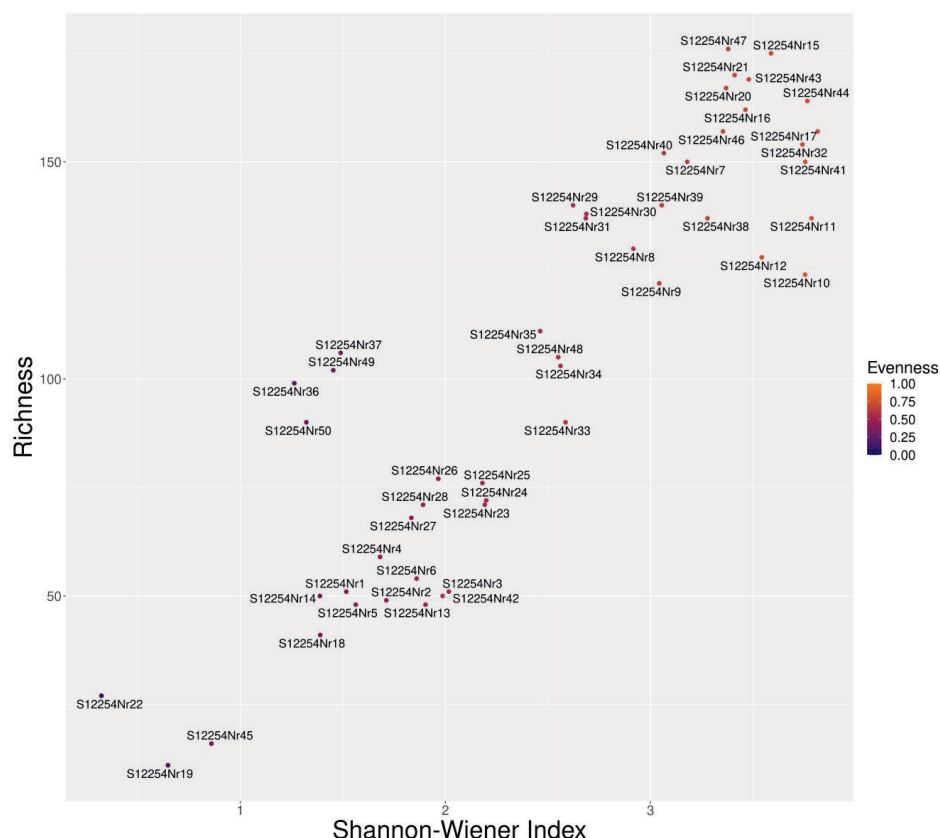


Рисунок 6 – Разнообразие всех образцов. Индекс Шеннона-Винера (основанный на натуральном логарифме) и разнообразие были рассчитаны для каждого образца на уровне видов и нанесены друг на друга. Более высокие индексы указывают на то, в образце присутствовало больше видов и что их относительное количество более равномерно. Цвет точек отражает видовую равномерность в каждом образце

Для оценки сходства между образцами были рассчитаны расстояния Брея-Кертиса с использованием относительного обилия последовательностей обнаруженных видов ($>0,01\%$), и был проведен анализ главных координат (РСоА) для определения местоположения каждого образца в двумерном пространстве (Рисунок 7). С помощью этого анализа можно выявить группы очень похожих образцов, а также отклонения.

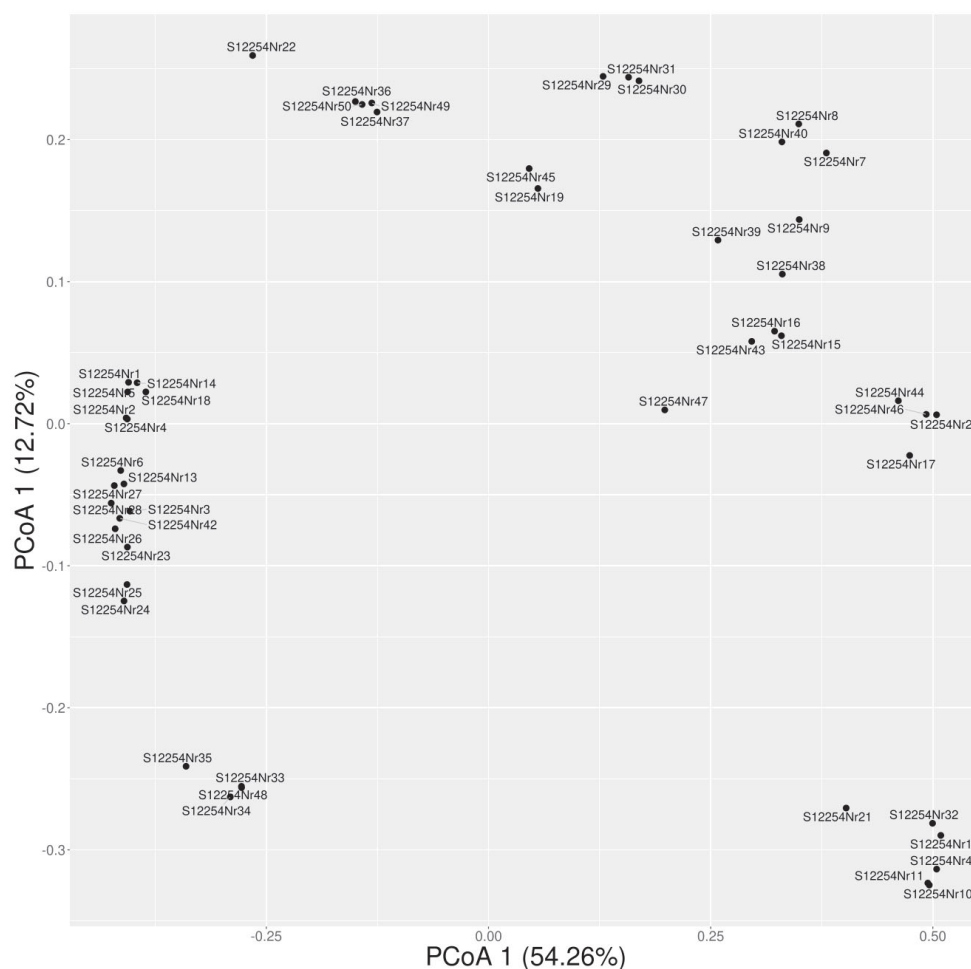


Рисунок 7 – PCoA всех образцов. Построены две главные оси, которые объясняют наибольшую вариативность данных. Если относительные количества последовательностей в двух образцах очень похожи, они расположены очень близко друг к другу

Для дальнейшего сравнения образцов были выделены 15 наиболее распространенных видов во всех образцах и образцы были кластеризованы на основе этих показателей. Риды, отображающиеся на другие виды, кроме 15 наиболее распространенных, объединены и помечены как «другие». Прочтения, сопоставленные с более чем одним видом, обозначены как «неспецифические» (рисунок 8).

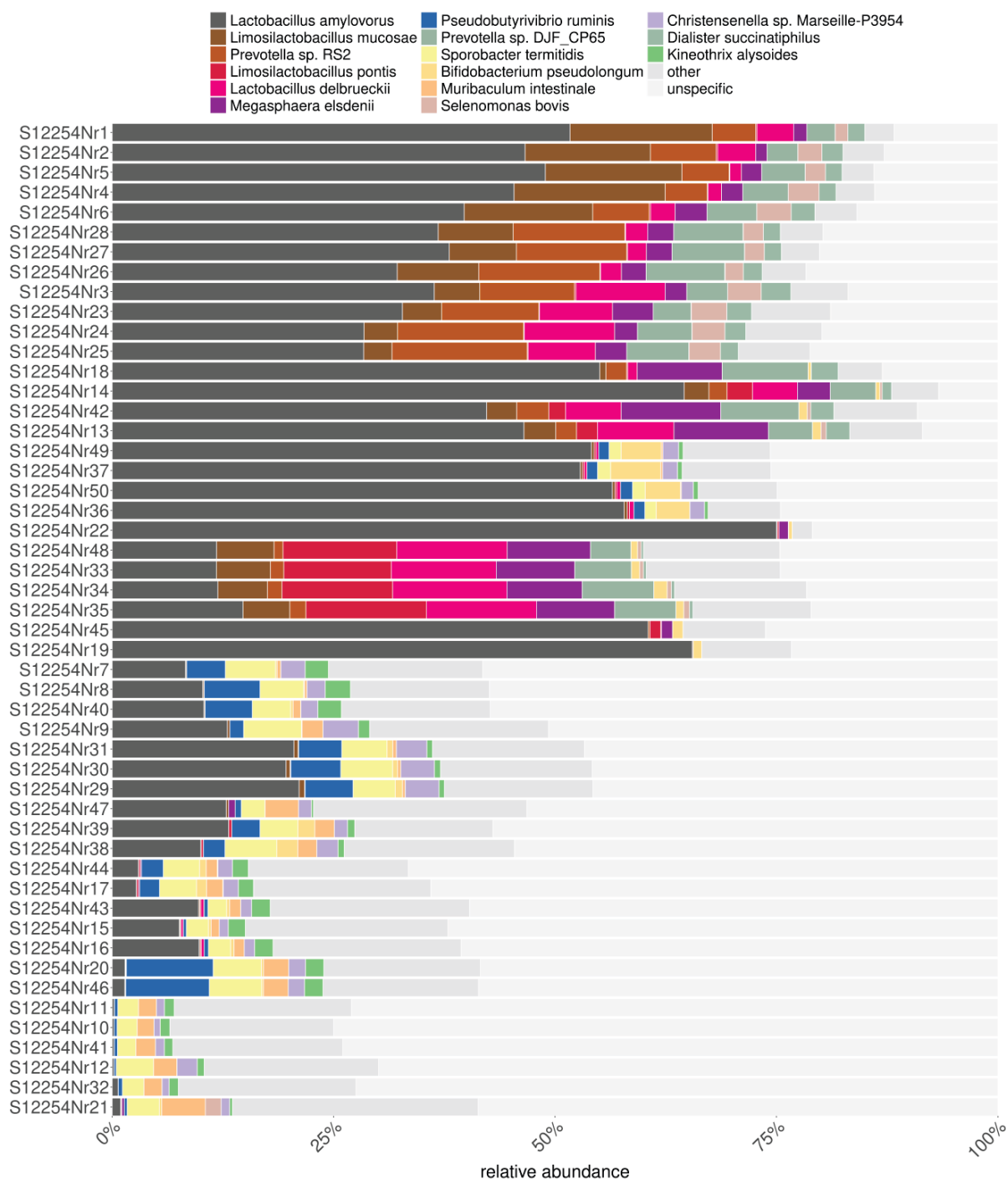


Рисунок 8 — Гистограммы относительного разнообразия последовательностей (на основе количества присвоенных родов) микробных видов с относительной частотой встречаемости $>0,01\%$ хотя бы в одном образце. Цвета, представляющие 15 наиболее распространенных видов, показаны справа. Количество всех остальных видов было суммировано и показано как «другие». Считывания, которые относятся более чем к одному виду, показаны как «неспецифические»

В ходе работы были получены метагеномные профили микробных сообществ в основных отделах желудочно-кишечного тракта свиньи. Для повышения репрезентативности создаваемой модели и проверки результатов метагеномного секвенирования было принято решение сформировать референтную базу данных микробиоты ключевых отделов ЖКТ свиньи. Она предназначена для упрощения и унификации воспроизведения микробиома в экспериментальной модели ЖКТ свиньи, для интерпретации результатов метагеномных исследований микробиоты, а также для валидации разработанной установки, имитирующей пищеварительный тракт свиньи, на последующих этапах проекта.

Анализ литературных данных позволил выделить критические временные точки, в которые происходят заметные изменения состава микробиоты. У поросят микробное сообщество существенно перестраивается в течение всего неонатального периода. Чаще всего кишечную микробиоту описывали на 1-е, 7-е и 21-е сутки жизни, при этом, как правило, изучались только фекальные образцы. Для 42-х суток имеются сведения уже о микробиоте тонкой кишки, толстой кишки и желудка. У взрослых свиней (старше шести месяцев) состав микробиоты относительно стабилен, и значимых возрастных колебаний выявить не удалось, в этой группе описаны микробные сообщества тонкой кишки (двенадцатиперстная, тощая, подвздошная), толстой кишки (слепая и прямая) и фекалий.

Исходя из этого, структура базы данных была организована следующим образом. На верхнем уровне предусмотрены два каталога: «Pigs» (взрослые свиньи) и «Piglets» (поросята). В каталоге «Pigs» на втором уровне выделены разделы «Small intestine», «Large intestine» и «Faeces». Раздел «Small intestine» включает подразделы «Duodenum», «Ileum» и «Jejunum», раздел «Large intestine» - подразделы «Caecum» и «Rectum». В каталоге «Piglets» на втором уровне созданы разделы «1 day», «7 days», «21 days» и «42 days»: первые три содержат подраздел «Faeces», а раздел «42 days» - подразделы «Small intestine» и «Large intestine». Конечным элементом каждого пути является таблица с качественным составом микробиоты соответствующего биотопа.

База данных структурирована по таксономическому принципу, включает сведения о филумах, типах и родах представителей нормальной микробиоты (всего 780 уникальных таксонов) и содержит ссылки на первоисточники. Для ее эксплуатации необходим x86/64-совместимый персональный компьютер, система управления базами данных PostgreSQL 15, операционная система Ubuntu Server 24.04; общий объем базы составляет 8,71 МБ. База зарегистрирована в установленном порядке: получено Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025620190 от 13 января 2025 г. «База данных качественного состава нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта *Sus scrofa domestica*».

3.3. Результаты апробации ИКС на модели ЖКТ свиньи

3.3.1. Условия эксперимента для культивирования

С целью оценки новизны и оригинальности разработанной искусственной кишечной среды (ИКС) в рамках настоящей работы был проведен сравнительный анализ ее компонентного состава и функциональных характеристик с рядом существующих аналогов. В сравнительный анализ были включены ключевые современные *in vitro*-модели кишечной среды свиней и поросят, ориентированные на разные отделы и возрастные группы: PolyFermS, воспроизводящая условия проксимального отдела толстой кишки взрослых свиней на среде на основе кукурузного крахмала, соевый пептон, муцина и ряда полисахаридов. Baby-SPIME, предназначенная для поросят в период лактации и после отъема и использующая два варианта среды (с добавлением заменителя молока и постотъемного рациона). Системы Pigut-IVM и M-Pigut-IVM, моделирующие толстую кишку поросят после отъема на питательной среде, имитирующей илеальный химус и мукозный компартмент. Разработанная в рамках диссертационной работы искусственная кишечная среда (ИКС) рассмотрена в этом ряду как комплексная система для моделирования кишечной среды свиней, где углеводные, белковые и эндогенные

компоненты подбираются целенаправленно для воспроизведения условий различных отделов желудочно-кишечного тракта.

Результаты сравнительного анализа показали, что существующие среды воспроизводят ограниченное число параметров кишечной среды при моделировании *in vitro*. В частности, они не позволяют в достаточной мере имитировать динамику процессов переваривания, субстратную неоднородность и фазность функционирования различных

Разработанная в нашем исследовании искусственная кишечная среда принципиально отличается многофазной организацией и реализована в виде двух последовательно функционирующих модулей, соответствующих тонкокишечному и толстокишечному отделам. Дополнительно в ее состав был включен ферментный комплекс (пепсин, трипсин, панкреатин), а также структурные компоненты, такие как микрокристаллическая целлюлоза и муцин, что обеспечивает более физиологически релевантное воспроизведение процессов пищеварения и микробной ферментации.

Основные отличия между разработанной ИКС и ранее предложенными аналогами обобщены и представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Сравнение разработанной искусственной кишечной среды (ИКС) с существующими аналогами.

Модель	Объект	Основные субстраты	Особенности модели
PolyFermS	Проксимальный отдел толстой кишки взрослых свиней	Основной углеводный компонент – кукурузный крахмал; белковый компонент – soy peptone; дополнительно mucin, yeast extract, pectin, xylan, arabinogalactan, guar gum	Ориентирована на проксимальный отдел толстой кишки и состав среды, приближенный к илеальному химусу

Окончание таблицы 5

Модель	Объект	Основные субстраты	Особенности модели
baby-SPIME	Поросята в период лактации и после отъема	Базовые компоненты обеих сред – mucin, proteose-peptone, potato starch; в лактационной среде добавлен заменитель молока Nuklospray Yoghurt, в постотъемной – рацион для поросят	Среда жестко привязана к двум возрастным состояниям: молочное кормление и постотъемный рацион
Pigut-IVM / M-Pigut-IVM	Толстая кишка поросят после отъема	Питательная среда имитирует илеальный химус с учетом переваримости компонентов корма; также используется mucin beads для моделирования мукозного компартмента	Акцент на постотъемный период и толстокишечную ферментацию
Разработанная ИКС	Моделирование кишечной среды тонкого и толстого отдела кишечника свиней	Углеводные, белковые и эндогенные компоненты среды подбираются целенаправленно для воспроизведения кишечных условий	Комплексная система, имитирующая тонкий и толстый отдел кишечника

Разработка рецептуры кишечной среды для моделирования желудочно-кишечного тракта свиней была выполнена на основе ранее предложенной унифицированной искусственной кишечной среды (УИКС) (Шебеко, С. К. с соавт., 2024) и предполагала внесение ряда принципиальных изменений, направленных на расширение функциональных возможностей модели и повышение степени ее соответствия физиологическим условиям *in vivo*.

При формировании модифицированной среды был проведен анализ научных источников, в которых рассматривались физико-химические характеристики отдельных отделов ЖКТ свиней, включая диапазоны pH, температурные параметры и скорость транзита пищевого химуса, особенности таксономического состава и метаболической активности кишечной микробиоты, а также спектр питательных веществ и субстратов, поступающих в различные отделы пищеварительного тракта.

Помимо разработки базового состава ИКС, необходимо было введение дополнительных компонентов. Это позволило адаптировать разработку по физиологию тонкого и толстого отдела ЖКТ свиней. Для воспроизведения работы поджелудочной железы в условиях тонкого отдела кишечника в модуль I был добавлен комплекс ферментов. Применение данного комплекса позволило смоделировать процессы гидролиза белков и липидов и приблизить метаболические условия *in vitro* к реальному пищеварению у свиней (Bedford MR, Schulze H., 1998). Для модуля II, имитирующего толстый отдел кишечника вводила микрокристаллическая целлюлоза, имитирующая балластную клетчатку. Благодаря такому неперевариваемому компоненту образуются биопленки и поддерживается развитие облигатных анаэробов, таких как представители родов *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* и *Roseburia*, особенно при моделировании пристеночной микробиоты (Kerr B.J., Shurson G.C., 2013).

Для воспроизведения работы поджелудочной железы в условиях тонкого отдела кишечника в модуль I был добавлен комплекс ферментов. Применение данного комплекса позволило смоделировать процессы гидролиза белков и липидов и приблизить метаболические условия *in vitro* к реальному пищеварению у свиней (Bedford MR, Schulze H., 1998).

Модуль I, моделирующий тонкий кишечник, включал микрокристаллическую целлюлозу в концентрации 5 г/л в качестве неперевариваемого субстрата, а также ферментный комплекс, состоящий из химотрипсина (1 мг/л), трипсина (3 мг/л) и панкреатина (3,5 г/л). Буферные системы обеспечивали поддержание pH на уровне 6,8–7,2, а все ферментативные компоненты добавляли после автоклавирования базовой среды.

Для воспроизведения условий толстого кишечника в модуле II в основу дополнительно вводили микрокристаллическую целлюлозу в концентрации 9 г/л, а при необходимости - пробиотические штаммы. Ферментные препараты на данном этапе не применяли, что позволяло поддерживать анаэробные условия и стабильное протекание микробной ферментации.

Контроль стерильности полученных сред осуществляли методом бактериологического анализа в соответствии с требованиями ГОСТ 28085–2013. Отсутствие роста посторонней микрофлоры подтверждало корректность проведения стерилизации и подготовки среды.

Несмотря на возрастающий интерес к *in vitro* моделированию кишечной микробиоты свиней, анализ существующих решений показывает явный дефицит валидированных искусственных кишечных сред, особенно в отечественной научной практике. На данный момент известна одна среда, которая воспроизводит микробиоту кур (Мазанко М. С. с соавт., 2022), но не является сложной комплексной системой, учитывающей ряд характеристик необходимых для моделирования *in vitro*.

ИКС является попыткой преодолеть существующие ограничения и недостатки. Разработка модульной организации, которая учитывает различия между тонким и толстым отделом кишечника позволяет приблизить условия культивирования к физиологии ЖКТ. Содержание структурных компонентов позволяет моделировать не только просветную, но и пристеночную микробиоту, что также является важным параметром для оценки межмикробных взаимодействий.

Апробация ИКС проводилась в установке иЖКТ, посредством культивирования в ней естественной кишечной микробиоты свиней. Установка состояла из двух секций (толстый и тонкий отдел кишечника), которая монтировалась в ламинарном боксе с соблюдением асептических условий. В биореакторы объемом 700 мл вносили ИКС, после чего настраивали режимы для моделирования условий тонкого и толстого отдела кишечника. Для модуля «тонкий кишечник» рН 7,2, для модуля «толстый кишечник» рН 6,5 при температуре 39 °С. После стабилизации всех параметров вносили пробы нативного материала свиней, отобранные из соответствующего отдела ЖКТ. Продолжительность эксперимента составила 21 день.

Полученные результаты подтвердили пригодность установки иЖКТ для воспроизведения микробиоты *in vitro*.

3.3.2. Моделирование кишечной микробиоты свиньи *in vitro* в автоматизированной системе имитации желудочно-кишечного тракта

Микробиологические показатели состава микробиоты образцов, отобранных от свиней, представлены в таблице 6. В целом полученные значения демонстрируют сопоставимые значения физиологической норме для данного вида животных и отражают типичное распределение микроорганизмов по отделам желудочно-кишечного тракта. Указанные показатели были использованы в качестве контрольных при проведении нашего исследования.

Таблица 6 - Количественное содержание исследуемых показателей кишечной микробиоты свиней, выявленное культуральным методом (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026).

Показатель	Содержание, КОЕ/г	
	Тонкая кишка	Толстая кишка
Общее микробное число	10^{11}	10^{12}
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^{10}	10^{10}
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^{10}	10^{10}
<i>Escherichia coli</i>	10^6	10^9
<i>Enterococcus spp.</i>	10^7	10^5

Количественный состав микробиоты, определенный методом ПЦР в реальном времени, представлен в таблице 7. Результаты молекулярного анализа в целом согласуются с данными культурального метода, что подтверждает сопоставимость и взаимную валидацию примененных подходов к оценке состава микробного сообщества.

Таблица 7 - Количественное содержание исследуемых показателей кишечной микробиоты свиней, выявленное методом кПЦР в нативном материале и системе имитации ЖКТ (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026)

Показатель	Содержание, КОЕ/г			
	Свинья, тонкая кишка	Модуль «Тонкая кишка», 12 день культивирования	Свинья, толстая кишка	Модуль «Толстая кишка», 12 сутки культивирования
Общая бактериальная масса	9×10^{11}	3×10^{12}	6×10^{12}	10^{12}
<i>Lactobacillus spp.</i>	2×10^{10}	7×10^9	2×10^{10}	4×10^{10}
<i>Bifidobacterium spp.</i>	8×10^{10}	10^{11}	4×10^{10}	9×10^{10}
<i>Escherichia coli</i>	4×10^6	3×10^7	4×10^9	10^9
<i>Bacteroides spp.</i>	3×10^7	9×10^6	9×10^{10}	9×10^9
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	4×10^9	4×10^8	7×10^7	7×10^6
<i>Enterococcus spp.</i>	2×10^7	2×10^7	1×10^5	1×10^5

Для оценки соответствия количественного профиля микробиоты в системе иЖКТ нативному кишечному материалу был проведён корреляционный анализ Спирмена. Между показателями нативной тонкой кишки и модуля «тонкая кишка» на 12-е сутки культивирования установлена сильная положительная корреляционная связь ($\rho = 0,857$, $p = 0,014$).

Между показателями нативного материала толстой кишки и модуля «толстая кишка» выявлена также сильная положительная корреляция ($\rho = 0,893$, $p = 0,007$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Полученные данные свидетельствуют о сохранении общего рангового соотношения исследуемых микробиологических показателей в соответствующих модулях системы иЖКТ.

Посуточная динамика микробиологических показателей содержимого модуля, имитирующего тонкий кишечник, в течение 21 суток культивирования представлена на рисунке 9.

Выбор продолжительности эксперимента был основан на данных научной литературы, согласно которым формирование стабильной кишечной микробиоты у свиней в постнеонатальном периоде занимает в среднем около трех недель (Sedova D. A. et al., 2025). Анализ динамики показал, что достижение относительного микробиологического равновесия, сопоставимого с показателями

нативного материала (таблицы 6 и 8), происходит на 7-е сутки культивирования и сохраняется до окончания эксперимента. Это свидетельствует о корректности заданных условий культивирования и адекватности состава искусственной кишечной среды.

Аналогичная динамика наблюдалась и в модуле, имитирующем толстый кишечник (рис. 10). В данном биореакторе стабилизация микробиологических показателей, соответствующих нативным образцам, отмечалась на 8-е сутки культивирования и сохранялась до 21-х суток эксперимента, что также подтверждает воспроизводимость условий моделирования.

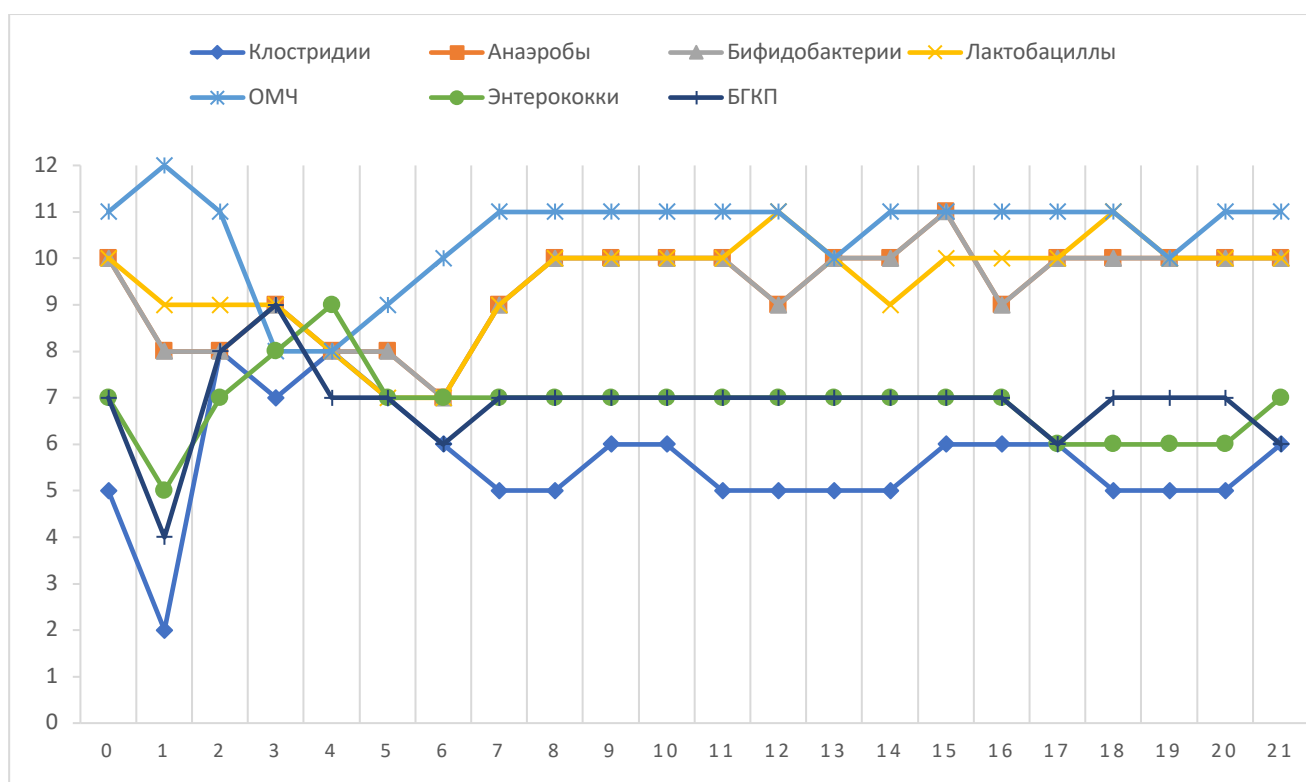


Рисунок 9 - Динамика микробиологических показателей модуля «тонкая кишка». По горизонтали – дни эксперимента; по вертикали – содержание КОЕ/мл (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026).

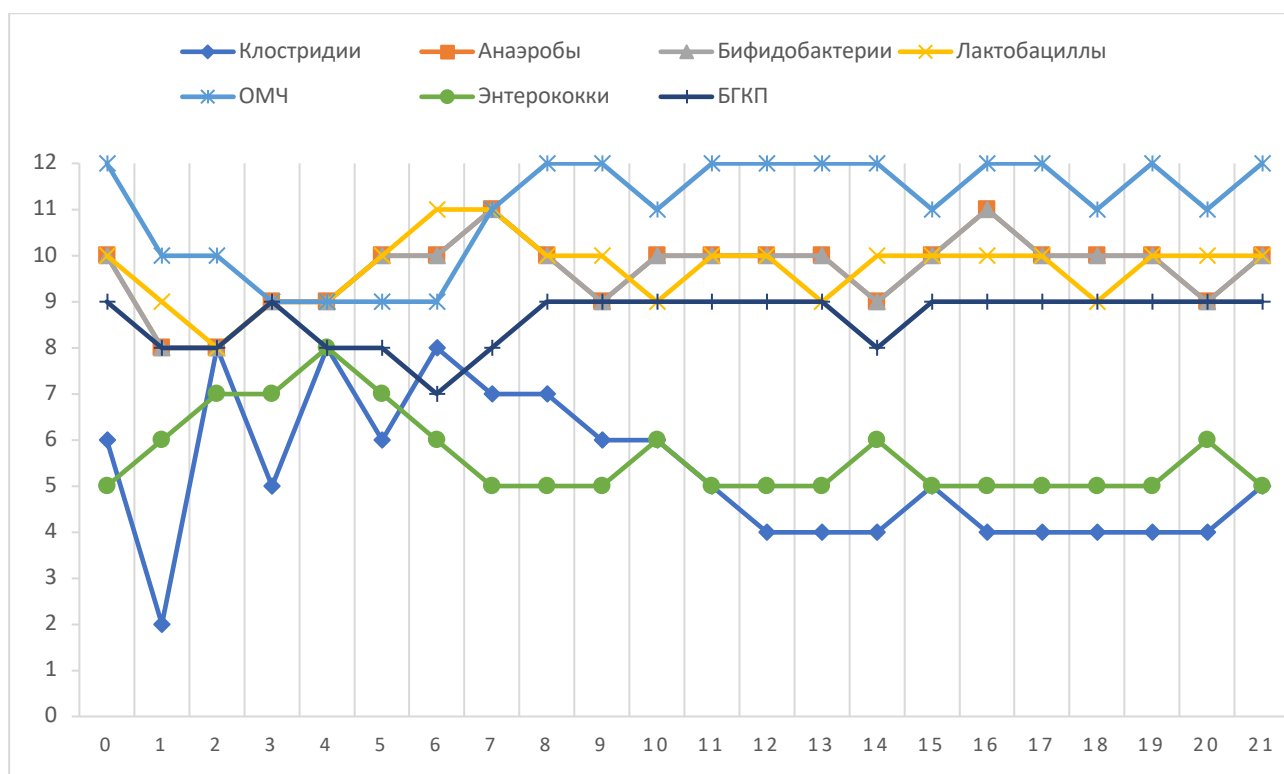


Рисунок 10 - Динамика микробиологических показателей модуля «толстая кишка». По горизонтали – дни эксперимента; по вертикали – содержание КОЕ/мл (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026).

Для проверки заявленного достижения микробиологического равновесия проведено сопоставление значений показателей в период стабилизации (7–21-е сутки для модуля «тонкая кишка», 8–21-е сутки для модуля «толстая кишка») с исходным уровнем нативного контроля с использованием критерия Уилкоксона для парных наблюдений. Для ОМЧ, анаэробов, лактобацилл, бифидобактерий и БГКП статистически значимых отличий от контроля не выявлено ($p > 0,05$), что подтверждает достижение стабильного состояния, сопоставимого с нативным материалом. В то же время содержание энтерококков и клостридий в обоих модулях статистически значимо отличались от контрольного уровня ($p < 0,05$), что указывает на неполное соответствие этих показателей нативному профилю даже в период относительной стабилизации культивирования. Данные группы особо чувствительны к условиям культивирования.

Результаты определения фенотипической антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных из нативных образцов, представлены в таблицах 9–

12. Видовая принадлежность выделенных изолятов подтверждена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. В таблице 8 представлены результаты масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов, выделенных из биореакторов иЖКТ.

Таблица 8 – Соотношение выделенных изолятов, идентифицированных методом MALDI-TOF MS

Вид микроорганизма	абс	%	Score
<i>Escherichia coli</i>	20	49,5	4,6
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	10,2	2,06
<i>Enterococcus faecium</i>	2	5,1	2,117
<i>Enterococcus gallinarum</i>	3	7,6	1,55
<i>Aerococcus viridans</i>	4	10,2	1,45
<i>Enterococcus hirae</i>	6	15,4	2,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	2,0	1,76
всего	39	100	

Из содержимого тонкой кишки свиньи было выделено 3 изолята *Escherichia coli*, из толстой кишки - 5 изолятов. Анализ антибиотикограмм показал устойчивость всех изолятов к цефтазидиму и цефотаксиму, при этом изоляты, полученные из толстой кишки, характеризовались в целом более выраженной антибиотикорезистентностью (таблица 9).

Таблица 9 - Чувствительность к антибиотикам изолятов *E. coli*, выделенных от свиньи (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026). Зеленым обозначены чувствительный (S), желтым – промежуточный (I) и красным – резистентный (R).

Антибиотик, мкг	Диаметр зоны подавления роста, мм							
	<i>Escherichia coli</i>							
	Тонкая кишка				Толстая кишка			
Амоксициллин/ к.к. 20/10	20	22	21	23	19	19	20	7

Окончание таблицы 9

Цефтазидим 30	19	20	0	0	0	0	12	0
Цефотаксим 30	23	23	0	10	15	0	0	13
Цефтриаксон 30	26	24	28	13	25	16	12	21
Ампициллин 10	18	19	23	15	15	11	12	0
Имипенем 10	25	22	30	14	22	22	23	22
Доксициклин 30	0	0	0	14	14	15	10	0
Офлоксацин 5	28	25	17	16	16	11	17	16
Гентамицин 10	20	20	22	18	22	20	20	20
Левомецетин 30	17	18	22	17	20	17	20	17
Тетрациклин 30	0	20	0	19	19	15	20	0

На 21-е сутки культивирования из системы иЖКТ было выделено 8 изолятов *E. coli* (3 - из модуля «тонкая кишка» и 5 - из модуля «толстая кишка»). Их профиль антибиотикорезистентности отличался от исходного, однако устойчивость к цефтазидиму и цефотаксиму в большинстве случаев сохранялась (таблица 10).

Таблица 10 - Чувствительность к антибиотикам изолятов *E. coli*, выделенных из системы имитации ЖКТ (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026). Зеленым обозначены чувствительный (S), желтым – промежуточный (I) и красным – резистентный изолят (R).

Антибиотик, мкг	Диаметр зоны подавления роста, мм							
	<i>Escherichia coli</i>							
	Модуль «тонкая кишка»			Модуль «толстая кишка»				
Амоксициллин/к.к. 20/10 мкг	20	23	19	22	18	19	20	24
Цефтазидим 30	16	19	21	0	0	0	0	24
Цефотаксим 30	21	27	19	0	12	0	0	27
Цефтриаксон 30	27	22	23	11	14	9	0	20
Ампициллин 10	22	19	19	0	14	11	0	18
Имипенем 10	28	22	25	20	24	20	23	27
Доксициклин 30	0	0	12	12	13	0	16	15
Офлоксацин 5	26	26	32	17	16	14	19	26

Окончание таблицы 10

Гентамицин 10	19	22	21	21	20	18	20	22
Левомецетин 30	20	20	20	15	16	17	19	18
Тетрациклин 30	18	20	20	17	17	0	19	19

Из нативных образцов кишечника свиньи было выделено 12 изолятов *Enterococcus spp.* (по 6 из тонкого и толстого отделов). Для всех изолятов была характерна устойчивость к левомецетину, эритромицину и тетрациклину, при этом более выраженный уровень антибиотикорезистентности наблюдался у штаммов, выделенных из тонкой кишки (таблица 11).

Таблица 11 - Чувствительность к антибиотикам изолятов *Enterococcus spp.*, выделенных от свиньи (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026). Зеленым обозначены чувствительный (S), желтым – промежуточный (I) и красным – резистентный изолят (R).

Антибиотик, мкг	Диаметр зоны подавления роста, мм											
	<i>Enterococcus spp.</i>											
	Тонкая кишка						Толстая кишка					
Амоксициллин/ к.к. 20/10 мкг	23	22	18	16	16	16	35	33	31	29	30	33
Бензилпенициллин 10	17	8	13	14	0	24	33	22	25	25	25	24
Ампициллин 10	14	18	18	15	17	21	30	32	27	27	27	28
Доксициклин 30	0	0	0	0	0	0	18	16	18	18	17	18
Ванкомицин 30	20	19	16	14	0	20	22	18	23	22	20	20
Гентамицин 120	0	0	0	0	25	0	17	17	16	18	17	14
Левомецетин 30	0	0	0	0	10	0	13	14	0	8	13	8
Эритромицин 15	0	0	0	0	22	0	20	0	21	15	0	15
Тетрациклин 30	0	0	0	0	0	0	18	17	16	17	18	16

Из системы иЖКТ на 21-е сутки культивирования было получено 9 изолятов *Enterococcus spp.* (5 - из модуля «тонкая кишка» и 4 - из модуля «толстая кишка»). Их профиль устойчивости существенно отличался от исходного, однако резистентность к левомецетину, эритромицину и тетрациклину в целом сохранялась. В модуле «тонкая кишка» был выявлен изолят, обладающий множественной устойчивостью ко всем исследуемым антибактериальным препаратам (таблица 12).

Таблица 12 - Чувствительность к антибиотикам изолятов *Enterococcus spp.*, выделенных из системы имитации ЖКТ (Тихменева (Ярушникова) с соавт., 2026). Зеленым обозначены чувствительный (S), желтым – промежуточный (I) и красным – резистентный изолят (R).

Антибиотик	Диаметр зоны подавления роста, мм								
	<i>Enterococcus spp</i>								
	*Модуль «тонкая кишка»					**Модуль «толстая кишка»			
Амоксициллин/ к.к. 20/10	13	23	23	40	17	49	25	19	17
Бензилпенициллин 10	0	25	20	35	12	36	21	13	20
Ампициллин 10	0	25	20	37	10	38	24	17	17
Доксициклин 30	0	25	0	28	0	30	0	19	0
Ванкомицин 30	16	24	15	25	18	38	20	21	19
Гентамицин 120	0	20	0	28	0	32	0	18	0
Левомецетин 30	0	17	0	25	0	25	0	15	0
Эритромицин 15	0	13	0	27	18	27	18	12	13
Тетрациклин 30	0	26	0	27	0	33	0	20	0

Сравнение долей чувствительных и нечувствительных (I+R) изолятов между исходным кишечным материалом и соответствующими модулями системы и ЖКТ выполняли с применением двустороннего точного критерия Фишера. Во всех изученных сравнениях статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$). Полученные результаты интерпретировали с учётом малого числа выделенных изолятов и рассматривали преимущественно как описательные.

Полученные данные указывают на выраженную динамику фенотипической антибиотикочувствительности бактерий в составе кишечной микробиоты при культивировании в модели *in vitro*, что позволяет рассматривать данную систему как перспективный инструмент для изучения механизмов формирования и трансформации антибиотикорезистентности.

В целом результаты исследования подтверждают, что разработанная автоматизированная система имитации желудочно-кишечного тракта свиньи обеспечивает воспроизводимое моделирование условий тонкого и толстого кишечника и позволяет формировать стабильное микробное сообщество, сопоставимое с нативным материалом. Совпадение данных культурального анализа и ПЦР повышает достоверность оценки состава микробиоты, а выявленная

динамика фенотипической антибиотикорезистентности подчеркивает потенциал модели иЖКТ как инструмента для контролируемого изучения распространения и трансформации генов устойчивости *in vitro*, при условии дальнейшей валидации результатов в экспериментах *in vivo*.

3.3.3. Изучение коррекции дисбиоза кишечной микробиоты свиней в модели искусственного желудочно-кишечного тракта

Микробиологические характеристики микробиоты исходных образцов от свиней представлены в таблице 13. Полученные показатели соответствуют литературным данным для микробиоценоза толстого отдела кишечника свиней и приняты в качестве контрольных значений для последующего моделирования.

Таблица 13 - Количественное содержание исследуемых показателей кишечной микробиоты свиней в толстом отделе кишечника, выявленное культуральным методом (Ярушникова с соавт., 2026).

Показатель	Содержание, КОЕ/г
Общее микробное число	10^{12}
<i>Lactobacillus</i> spp	10^8
<i>Bifidobacterium</i> spp	10^7
<i>Escherichia coli</i>	10^8
<i>Enterococcus</i> spp	10^4
<i>Clostridium</i> spp.	10^9

При построении модели микробиоценоза в качестве целевых ориентиров использовали принятые критерии дисбактериоза, включающие снижение численности облигатной микрофлоры (бифидобактерий, лактобацилл) и рост популяций условно-патогенных микроорганизмов. В результате внесения Амоксигарда в реакторы системы иЖКТ и последующей трехдневной стабилизации был сформирован микробиоценоз, соответствующий дисбиотическому состоянию кишечника.

На рисунке 11 представлена посуточная динамика микробиологических показателей содержимого модуля, моделирующего толстый отдел кишечника, в течение 9 дней эксперимента. По графику видно, что динамическое равновесие в биореакторе устанавливается к 3-м суткам культивирования.

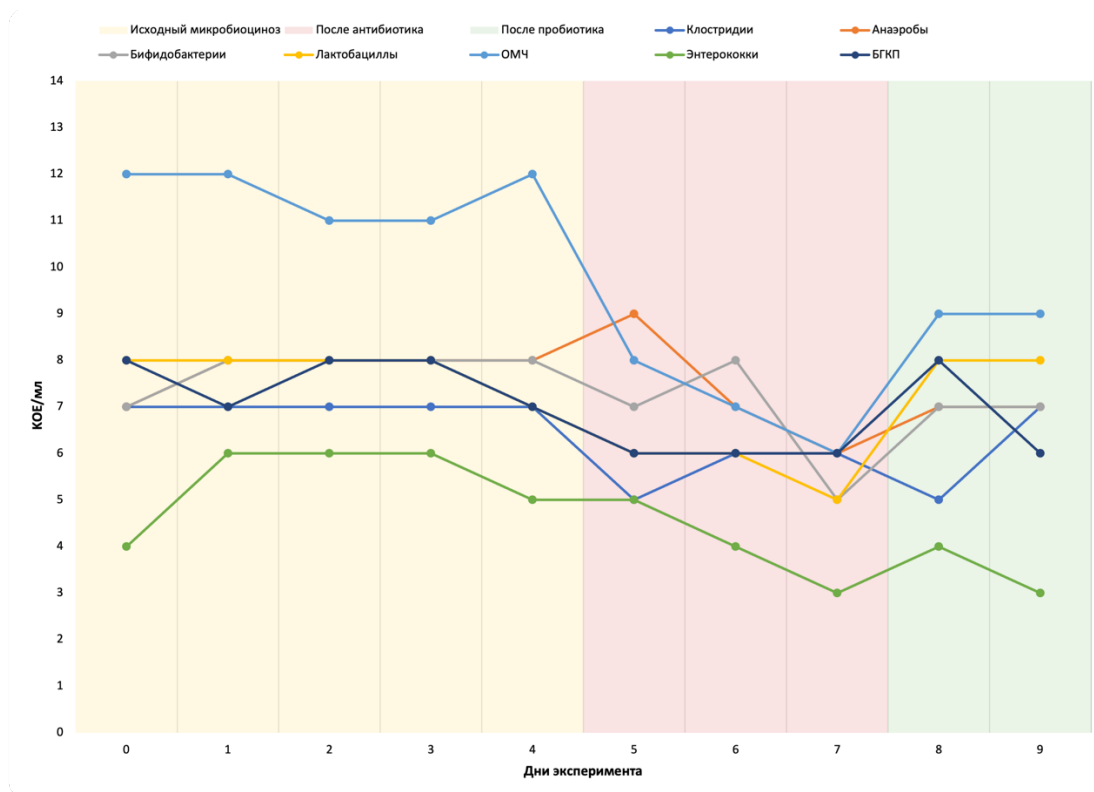


Рисунок 11 – Динамика микробиологических показателей модуля «толстая кишка». По горизонтали – дни эксперимента; по вертикали – содержание КОЕ/мл (Ярушникова с соавт., 2026)

В период до 4-х суток исходный микробиоценоз оставался стабильным: общее микробное число составляло 10^{11} – 10^{12} КОЕ/г, лактобациллы, бифидобактерии, облигатные анаэробы и БГКП находились на уровне 10^7 – 10^8 КОЕ/г, клостридии – около 10^7 КОЕ/г, энтерококки – 10^4 – 10^6 КОЕ/г. Внутри этого интервала колебания показателей не превышали одного порядка, что позволяет рассматривать данные значения как индивидуальную норму для животных исследуемой группы.

Внесение амоксициллина (5–7-е сутки) не сопровождалось немедленным изменением параметров: на 5-е сутки все показатели сохранялись на исходном

уровне, снижение регистрировалось с 6-х суток. Применение антибиотика в системе иЖКТ вызвало выраженный и статистически подтверждённый антимикробный эффект: содержание клостридий снизилось с 10^7 до 10^6 КОЕ/мл ($p=0,030$), лактобацилл - с 10^8 до 10^6 КОЕ/мл ($p=0,042$), ОМЧ - с 10^{11} до 10^7 КОЕ/мл ($p=0,048$), БГКП - с 10^7 до 10^6 КОЕ/мл ($p=0,040$) относительно исходного уровня, определённого как медиана показателей за первые 4 дня культивирования (дни 1–4) (критерий Манна—Уитни). Это подтверждает высокую чувствительность модели иЖКТ к антибактериальному воздействию и её пригодность для оценки эффектов антимикробных препаратов на кишечную микробиоту.

Действующее вещество препарата, амоксициллин, представляет собой полусинтетический аминопенициллин с бактерицидным механизмом, реализуемым через связывание пенициллин-связывающих белков и блокаду транспептидации пептидогликана. Его спектр охватывает грамположительную флору и часть грамотрицательных энтеробактерий, однако препарат инактивируется β -лактамазами, широко представленными у комменсалов кишечника (Парини М. с соавт., 2022). Это согласуется с наблюдаемой картиной: наибольшую чувствительность демонстрировали грамположительные лактобациллы (снижение с 10^7 – 10^8 до 10^6 КОЕ/г) и общее микробное число (падение ОМЧ на пять порядков к 7-м суткам), тогда как БГКП уменьшались лишь на 1–2 порядка, что соответствует представлению о резервуаре β -лактамазной активности у энтеробактерий. Максимальное угнетение микробиоценоза приходилось на 8-е сутки – первые сутки после отмены антибиотика и начала введения пробиотика: в этот момент минимальных значений достигали бифидобактерии и лактобациллы (по 10^5 КОЕ/г), общее микробное число и анаэробы (по 10^6 КОЕ/г), энтерококки – 10^3 КОЕ/г. облигатные анаэробы, бифидобактерии и энтерококки продемонстрировали более устойчивый профиль: значимых различий не установлено ($p>0,05$), при этом энтерококки показали выраженную тенденцию к снижению ($p=0,064$), приближающуюся к порогу значимости — это согласуется с известной избирательной чувствительностью разных таксономических групп к антибиотикотерапии.

Применяемый пробиотический препарат содержал два штамма *B. subtilis* – 11В и 12В – в титре не менее 1×10^8 КОЕ/мл, заявленный механизм его действия включает продукцию антибиотических веществ полипептидной природы, гидролитических ферментов (протеазы, амилазы, гемицеллюлазы), витаминов и аминокислот, а также подавление условно-патогенной микрофлоры. Для вида *B. subtilis* в целом описан широкий спектр антимикробных метаболитов – циклические липопептиды (сурфактин, итурин, фенгицин), бактериоцины и дипептид бацилизин (Вагапов Ф. Ф., Семерикова А. И., Тагиров Х. Х., 2017; Вагапов, Ф. Ф., 2017).

На фоне применения пробиотика (8–9-е сутки) изменения микробиоты носили неоднородный характер. Лактобациллы и бифидобактерии восстанавливались быстрее других групп: к 9-м суткам их содержание возвращалось к фоновым значениям (10^8 и 10^7 КОЕ/г соответственно), тогда как общее микробное число оставалось на 2–3 порядка ниже исходного уровня. Концентрации энтерококков (10^3 КОЕ/г) и БГКП (10^6 КОЕ/г) к окончанию опыта также не нормализовались, тогда как клостридии возвращались к исходным 10^7 КОЕ/г, при этом численность *Bacillus subtilis* удерживалась на уровне 10^7 КОЕ/г в течение 3 дней. Хотя это изменение не достигло статистической значимости при текущем объеме выборки, сама динамика убедительно демонстрирует восстановительный потенциал пробиотической коррекции в модели.

К завершению курса пробиотика соотношение основных групп смещалось в пользу облигатной лакто- и бифидофлоры при сохраняющемся дефиците условно-патогенных представителей (БГКП, энтерококки) и общей микробной массы. Финальное сопоставление исходного уровня с состоянием после пробиотика не выявило значимых различий ни по одному показателю ($p > 0,05$), что говорит об успешном возвращении системы к состоянию, статистически неотличимому от исходного. Модель иЖКТ воспроизвела ожидаемую динамику "нарушение - восстановление", характерную для реального кишечного тракта после антибиотикотерапии и пробиотической поддержки.

В таблице 14 представлены данные о количественном составе кишечной микробиоты, выявленном методом ПЦР с помощью коммерческого набора «Колонофлор-16 (биоценоз)».

Данные ПЦР в целом воспроизводили ту же тенденцию изменений микробиоценоза, однако количественные показатели, полученные молекулярным и культуральным методами, расходились. Это обусловлено различиями в аналитической чувствительности подходов и в характере регистрируемых мишеней (ДНК против жизнеспособных клеток).

Таблица 14 – Количественное содержание исследуемых показателей кишечной микробиоты свиней, выявленное методом кПЦР в нативном материале и отобранном из системы иЖКТ (Ярушникова с соавт., 2026)

Показатель	Содержание, копий/мл			
	Цельная проба	3 день культивирования	После антибиотика 6 день культивирования	После пробиотика 9 день культивирования
Общая бактериальная масса	2×10^{11}	2×10^{13}	3×10^{11}	2×10^{12}
<i>Lactobacillus</i> spp	9×10^7	3×10^{10}	6×10^9	5×10^9
<i>Bifidobacterium</i> spp	3×10^8	5×10^{11}	6×10^9	9×10^9
<i>Escherichia coli</i>	4×10^8	4×10^9	8×10^8	10^9
<i>Bacteroides</i> spp	10^{11}	2×10^{13}	3×10^{11}	2×10^{11}
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	2×10^7	7×10^6	8×10^6	6×10^5

Облигатные анаэробы, бифидобактерии и энтерококки продемонстрировали более устойчивый профиль: значимых различий не установлено ($p > 0,05$), при этом энтерококки показали выраженную тенденцию к снижению ($p = 0,064$), приближающуюся к порогу значимости — это согласуется с известной

избирательной чувствительностью разных таксономических групп к антибиотикотерапии.

После курса пробиотика зафиксировано заметное восстановление отдельных показателей — в частности, лактобациллы вернулись с 10^6 до 10^8 КОЕ/мл, приблизившись к исходному уровню. Хотя это изменение не достигло статистической значимости при текущем объеме выборки ($n=2$), сама динамика убедительно демонстрирует восстановительный потенциал пробиотической коррекции в модели.

Финальное сопоставление исходного уровня с состоянием после пробиотика не выявило значимых различий ни по одному показателю ($p>0,05$), что говорит об успешном возвращении системы к состоянию, статистически неотличимому от исходного - то есть модель иЖКТ воспроизвела ожидаемую динамику "нарушение → восстановление", характерную для реального кишечного тракта после антибиотикотерапии и пробиотической поддержки.

В *in vitro*-модели ЖКТ свиньи прослеживалась последовательная смена состояний кишечного микробиоценоза: от исходного стабильного профиля через антибиотик-ассоциированный дисбиоз к фазе пробиотической коррекции. Введение Амоксигарда приводило к снижению численности облигатной микрофлоры (лактобацилл, бифидобактерий, общей микробной массы) и, в меньшей степени, части условно-патогенных энтеробактерий, при этом максимальное угнетение микробиоценоза наблюдалось на 8-е сутки, в первые сутки после отмены антибиотика.

На фоне последующего применения пробиотика Ветоспорин Ж на основе *Bacillus subtilis* содержание лактобацилл и бифидобактерий к 9-м суткам возвращалось к фоновым значениям, тогда как показатели условно-патогенной группы (БГКП, энтерококки) и общее микробное число к окончанию опыта восстанавливались лишь частично. Такая динамика может отражать различную устойчивость отдельных таксонов к последствиям антибиотикотерапии и различную скорость их ответа на пробиотическую коррекцию, однако в рамках проведенного исследования сделать однозначные выводы о механизмах этих

различий невозможно. Тем не менее полученные результаты позволяют предположить, что назначение спорообразующего пробиотика после курса антибиотика способствует более быстрому восстановлению отдельных групп облигатной микрофлоры, данный вывод требует подтверждения в дальнейших исследованиях на более крупных сериях наблюдений.

3.4. Обсуждение результатов исследования

В последние годы, с развитием методов, не требующих культивирования, стало очевидно, что кишечные бактерии оказывают значительное влияние на здоровье человека и животных. Однако из-за того, что треть генов не имеет аннотаций, сложно определить функции всех кишечных бактерий с помощью *in silico*-анализа, поэтому необходимо изучать кишечные бактерии путем их культивирования. Кроме того, для культивирования кишечных бактерий используются различные среды, рекомендованные для каждой отдельной бактерии, однако приготовление каждой среды — сложный процесс. Для одновременного культивирования множества бактерий и сравнения их фенотипов в одних и тех же условиях необходима среда, способная культивировать широкий спектр бактерий (Hirano R. et al., 2023). Поэтому необходимо создавать системы максимально приближенные к условиям *in vivo*, включающие поддержание анаэробноза, сложный субстратный состав, контроль параметров температуры и pH.

Искусственные кишечные среды представляют собой специализированные питательные системы, направленные на воспроизведение физико-химических характеристик и субстратного состава внутренней среды кишечника.

Следует отметить, что в отечественной литературе описана лишь одна искусственная кишечная среда, предназначенная для моделирования микробиоты кишечника кур (Мазанко М. С. с соавт., 2022; Шебеко с соавт., 2024). Однако примененный в этом исследовании подход к валидации основывался на использовании *lux*-биосенсоров, которые не относятся к общепринятым методам комплексного анализа микробных сообществ. Кроме того, оценка роста была

ограничена исключительно представителями рода *Lactobacillus*, тогда как кишечная микробиота данного вида характеризуется высоким таксономическим разнообразием и включает широкий спектр функционально значимых бактериальных родов (Шебеко с соавт., 2024). Эти обстоятельства не позволяют рассматривать данную среду как полноценно валидированную модель кишечной экосистемы. Зарубежные исследователи глубже изучили данный вопрос, однако разработанные модели все равно имеют ограничения. В отличие от специализированных сред PolyFermS, baby-SPIME и Pigut-IVM, разработанных для узкого возрастного или анатомического диапазона (проксимальный отдел толстой кишки взрослых свиней, ЖКТ поросят-сосунов или поросят после отъёма соответственно), разработанная в настоящем исследовании среда культивирования ориентирована на одновременное моделирование как тонкого, так и толстого отделов кишечника свиньи в рамках единой модульной системы ЖКТ (Durif et al., 2025; Dufourny, S., 2022; Tanner S. A., et al. 2014) .

Актуальность *in vitro* исследований микробиоты ЖКТ определяется рядом фундаментальных и прикладных факторов. Прежде всего, такие модели позволяют преодолеть ограничение, присущее *in vivo* экспериментам, связанное с высокой межиндивидуальной вариабельностью микробиоты. На состав микробиоты влияют генетические особенности, возраст, рацион, условия содержания и даже географическое расположение (Fathima S. et al., 2022; Sedova A.D. et al., 2025). Модели *in vitro* решают эту проблему путем стандартизации условий, что позволяет достоверно устанавливать связь между экспериментальным воздействием и наблюдаемыми эффектами (Rehman H. U. et al., 2007; Тихменева (Ярушникова) Ю.А., Попов И.Г., Ермаков А.М., 2026).

Для оптимизации ресурсов исследователей и снижения количества экспериментальных животных применяется предварительный скрининг препаратов и их комбинаций. Такой подход позволяет отобрать наиболее перспективные и безопасные варианты для проведения масштабных испытаний *in vivo* (Rehman H. U. et al., 2007; Christl S. U. et al., 1997). Более того, именно *in vitro* подходы создают условия для детального анализа механизмов действия добавок на

молекулярном и клеточном уровнях, включая конкурентное исключение патогенов, регуляцию продукции антимикробных соединений, метаболизм короткоцепочечных жирных кислот и влияние на иммунный ответ кишечного эпителия (Fathima S. et al., 2022). Без такого фундаментального понимания разработка целенаправленных и эффективных продуктов нового поколения была бы существенно затруднена (Тихменева (Ярушникова) Ю.А., Попов И.Г., Ермаков А.М., 2026).

Одним из условий адекватного *in vitro*-моделирования процессов, происходящих в ЖКТ свиней, является воспроизведение не только состава питательной среды и ферментативной активности, но и физических свойств кишечного содержимого. К числу наиболее значимых параметров относятся вязкость, вязкоупругость и характер течения химуса, которые определяют особенности перемешивания, продвижения субстратов и взаимодействия микроорганизмов со средой. В нашем исследовании мы увидели, что при увеличении скорости вращения вязкость разработанной ИКС снижалась. Тонкокишечный и толстокишечный варианты демонстрировали псевдопластическое поведение. Полученные данные согласуются с литературными данными о реологии химуса свиней, для которого также описывают снижение вязкости при увеличении скорости сдвига (Hung et al., 2022; Wu et al., 2016). Реологические характеристики химуса у свиней демонстрируют более выраженные вязкоупругие свойства, что связано с морфофункциональными особенностями моногастрического ЖКТ и характером питания. В исследовании Wu et al. (2016) образцы желудочного содержимого были охарактеризованы как суспензии с преобладанием частиц, демонстрирующие поведение слабого геля или системы с более выраженными твердоподобными свойствами: модуль накопления G' превышал модуль потерь G'' в условиях малоамплитудных осцилляционных измерений. Следовательно, разработанная ИКС может воспроизводить один из значимых физических параметров кишечной среды, необходимый для её применения в системе иЖКТ.

В ходе исследования была установлена согласованность количественных оценок состава микробиоты, полученных культуральным методом и методом кПЦР в реальном времени как в отношении нативного материала, так и проб, отобранных из системы иЖКТ. Это свидетельствует о достоверности мониторинга микробного сообщества, поскольку культуральный подход обеспечивает оценку жизнеспособной фракции и дает возможность получения изолятов для дальнейших фенотипических тестов, тогда как кПЦР позволяет более стабильно и чувствительно фиксировать динамику общей бактериальной массы и целевых таксонов. Данный результат является важным признаком пригодности модели для последующих исследований, где требуется одновременная оценка микробного профиля и выделение культур для углубленного анализа. Наиболее полная оценка состояния кишечной микробиоты достигается при сочетании культуральных, молекулярно-генетических и физико-химических методов (Lagier J.C. et al., 2018; Mun D. et al. 2021; Sedova D. A. et al., 2025; Fu H. et al., 2021). Вместе с тем аналитические методы позволяют охарактеризовать состав, численность и функциональное состояние микробиоты только в момент отбора образца. Но для изучения воздействия на микробиоту таких факторов как кормовые добавки и фармацевтические препараты необходимо учитывать межмикробные взаимодействия и динамику сообщества (Sedova D. A. et al., 2025). Модельные системы *in vitro*, воспроизводящих ключевые параметры кишечной среды, обеспечивают изучение данных процессов.

Кроме того, полученные результаты подтвердили перспективность разработанной установки как инструмента для контролируемого изучения динамики фенотипической антибиотикорезистентности бактерий *in vitro*.

Следующим этапом оценки возможностей модели стало воспроизведение антибиотик-ассоциированных изменений микробного сообщества под действием амоксициллина. Внесение амоксициллина после стабилизации микробного сообщества сопровождалось снижением численности исследованных групп микроорганизмов, что подтверждает возможность моделирования антибиотик-ассоциированных изменений в толстокишечном модуле иЖКТ. После внесения

препарата на основе *Bacillus subtilis* наблюдалось восстановление лактобацилл и бифидобактерий, тогда как часть других показателей не достигала исходного уровня. Механизмы, определяющие такую избирательность, в рамках работы специально не исследовались, однако наблюдаемая картина согласуется с известными свойствами *B. subtilis*: как факультативный анаэроб он способен потреблять остаточный кислород и снижать редокс-потенциал среды, что может благоприятствовать облигатным анаэробам, описана также защита молочнокислых бактерий внеклеточным матриксом бацилл. (Вагапов Ф. Ф., Семерикова А. И., Тагиров Х. Х., 2017; Вагапов, Ф. Ф., 2017). Сдерживание энтеробактерий и энтерококков может быть связано с антагонистической активностью бацилл и конкуренцией за субстрат. Проверка этих предположений требует целенаправленных исследований – мониторинга окислительно-восстановительных характеристик среды, оценки антагонизма *in vitro* и постановки вариантов опыта без введения пробиотика. Неполное восстановление отдельных групп микроорганизмов к концу наблюдения может отражать как сохраняющееся постантибиотическое смещение микробиоценоза, так и селективный эффект пробиотической коррекции, что также требует более длительных наблюдений. Наблюдаемое в настоящем исследовании частичное восстановление отдельных показателей (в частности, лактобацилл) после применения пробиотика соответствует общей концепции, представленной в литературе: динамические ферментационные модели, включая TIM-2 и SIMGI, применяются для оценки способности пробиотических штаммов стимулировать восстановление комменсальной микробиоты после антибиотик-индуцированного дисбиоза за счёт колонизационной активности и продукции антимикробных метаболитов (Huangfu W. et al., 2024). Полученные данные подтверждают принципиальную возможность использования разработанной модели ЖКТ для скрининга эффектов антимикробных препаратов и пробиотических культур в соответствии с принципом 3R (Replacement, Reduction, Refinement), что согласуется с общей тенденцией применения *in vitro* моделей ЖКТ свиней, отмеченной в обзоре литературы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, проведенные в диссертационной работе, включали разработку и апробацию ИКС свиньи в экспериментальных условиях. Были воспроизведены условия *in vitro*, приближенные к физиологической норме с сохранением микробной ферментации. Методы включали анализ таксономического состава микробных сообществ, оценка их разнообразия и дифференциального обилия, исследование ключевых физико-химических параметров среды и микробиологические характеристики сообщества, выращенного в ИКС определили корректность функционирования модели. Также была проведена оценка влияния препарата на основе амоксициллина на состав и структуру кишечной микробиоты свиней и динамика восстановления после введения пробиотического препарата на основе *Bacillus subtilis*. Полученные данные показали избирательное восстановление облигатной микрофлоры и устойчивость отдельных таксонов к антимикробным препаратам.

В ходе исследования была установлена согласованность количественных оценок состава микробиоты, полученных культуральным методом и методом кПЦР в реальном времени как в отношении нативного материала, так и проб, отобранных из системы иЖКТ. Это свидетельствует о достоверности мониторинга микробного сообщества, поскольку культуральный подход обеспечивает оценку жизнеспособной фракции и дает возможность получения изолятов для дальнейших фенотипических тестов, тогда как кПЦР позволяет более стабильно и чувствительно фиксировать динамику общей бактериальной массы и целевых таксонов. Данный результат является важным признаком пригодности модели для последующих исследований, где требуется одновременная оценка микробного профиля и выделение культур для углубленного анализа.

Установка иЖКТ в сочетании с разработанной ИКС представляет собой *in vitro* платформу, позволяющую имитировать транзит химуса, поддержание pH и температуры, ключевые параметры пищеварения и микробной ферментации. Вместе это обеспечивает приближенную к условиям *in vivo* модель, что

существенно расширяет возможности экспериментальной оценки влияния антибиотиков и пробиотиков на кишечную микробиоту свиней и снижает потребность в длительных и дорогостоящих исследованиях на животных.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования позволяют сформулировать следующие выводы:

1. Разработана искусственная кишечная среда с модульной организацией, включающая тонкокишечный модуль (трипсин 3 мг/л, химотрипсин 1 мг/л, панкреатин 3,5 г/л, при pH $7,0 \pm 0,1$) и толстокишечный модуль (микрористаллическая целлюлоза 9 г/л, при pH $6,7 \pm 0,1$), основанная на комплексе питательных, минеральных и ростовых компонентов (пектин, ксилан, арабиногалактан, амилопектин, крахмал, казеин, бактопептон, стерильную бычью желчь, минеральные соли, гемин, п-аминобензойную кислоту, твин-80, витамины и цистеин·HCl). Подобранный состав обеспечивает воспроизведение вязкости кишечного содержимого на уровне $408,9 \pm 155,4$ мПа·с в тонком и $527,4 \pm 266,4$ мПа·с в толстом отделе. Выбранный диапазон характеризует структурированную дисперсную среду, моделирующую измельченный химус, и обеспечивает ее псевдопластическое поведение. Разработанная ИКС воспроизводит минимальный набор физико-химических параметров, обеспечивающих функциональную достаточность *in vitro*-модели кишечной среды свиней

2. При моделировании свиной микробиоты в разработанной среде в условиях системы имитации ЖКТ формирование стабильного микробного сообщества достигалось на 7-е сутки в модуле тонкой кишки и на 8-е сутки в модуле толстой кишки и сохранялось до конца эксперимента (до 21 суток). Качественные и количественные показатели микробиоты соответствовали нативному материалу от свиней (общее микробное число порядка 10^{11} – 10^{12} КОЕ/г, *Lactobacillus spp.* 10^9 – 10^{10} КОЕ/г, *Bifidobacterium spp.* 10^{10} – 10^{11} КОЕ/г, *Escherichia coli* 10^6 – 10^9 КОЕ/г, *Bacteroides spp.* 10^7 – 10^{10} КОЕ/г, *Faecalibacterium prausnitzii* 10^7 – 10^9 КОЕ/г, *Enterococcus spp.* 10^5 – 10^7 КОЕ/г). Корреляционный анализ Спирмена показал

сильную положительную связь, что подтверждает вывод. Результаты, полученные методом ПЦР и культуральными методами, демонстрировали однонаправленные изменения исследуемых показателей и в совокупности подтверждали сохранение основных характеристик кишечной микробиоты свиней.

3. Исследование амоксициллин-индуцированного дисбиоза кишечного микробиоценоза свиней в условиях системы имитации ЖКТ доказало целесообразность применения разработанной кишечной среды. Внесение амоксициллина в дозе 16 мг/л на 5–7-е сутки культивирования приводило к нарушению динамического равновесия микробиоценоза: к 7–8-м суткам общее микробное число снижалась с 10^{11} – 10^{12} до 10^6 КОЕ/г, численность *Lactobacillus spp.* – с 10^7 – 10^8 до 10^5 КОЕ/г и *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.* и *Escherichia coli* – с 10^7 – 10^8 до 10^6 КОЕ/г, а *Enterococcus spp.* – с 10^6 до 10^3 КОЕ/г. Последующее применение пробиотического препарата на основе *Bacillus subtilis* в терапевтической дозе 10 мл/л на 8–9-е сутки сопровождалось опережающим восстановлением облигатной микрофлоры: к 9-м суткам численность *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* достигала исходных значений, при неполной нормализации условно- патогенной флоры.

4. Разработанная кишечная среда перспективна для внедрения в практику микробиологических и ветеринарных исследований с применением систем имитации ЖКТ.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Для предварительного скрининга антимикробных, пробиотических препаратов, кормовых добавок и других исследуемых веществ на кишечную микробиоту свиней рекомендуется использовать разработанную ИКС в составе динамической системы иЖКТ. Динамику исследуемых групп микроорганизмов необходимо комплексно оценивать культуральными методами, ПЦР в реальном времени и MALDI-TOF масс-спектрометрией выделенных изолятов.

2. Для получения стандартизированной динамической *in vitro*-модели кишечной микробиоты свиней рекомендуется использовать разработанную ИКС в системе имитации ЖКТ. Продолжительность предварительного культивирования должна составлять не менее 7–8 суток, необходимых для стабилизации исследованных микробиологических показателей. Модель пригодна для проведения экспериментов длительностью не менее 21 суток.

3. Для изучения фенотипической антибиотикочувствительности микроорганизмов в динамической *in vitro*-модели рекомендуется проводить её определение до начала культивирования и после завершения эксперимента. Это позволяет сопоставлять профиль чувствительности изолятов нативного материала с изолятами, выделенными из модулей и ЖКТ, и оценивать сохранение или изменение фенотипической устойчивости в контролируемых условиях культивирования.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные результаты исследования подтверждают перспективность ИКС, как инструмента для изучения кишечной микробиоты в контролируемых условиях. Разработанную среду рекомендуется использовать как промежуточный этап между исследованиями на отдельных культурах микроорганизмов и опытами на животных. Это позволит предварительно оценить действие исследуемых препаратов в условиях микробного сообщества, сократить число малоинформативных опытов на животных и обеспечить более обоснованный выбор вариантов для последующей *in vivo*-проверки.

Разработанный подход к моделированию кишечной микробиоты свиней может быть использован при совершенствовании методов ветеринарно-микробиологической оценки кормовых и биологических препаратов.

Целесообразно проведение дальнейших исследований, направленных на адаптацию состава ИКС для моделирования влияния различных рационов,

стрессовых факторов, кишечных инфекций и лекарственных препаратов на микробиоту в динамической системе иЖКТ. Изучение метаболитов позволит точнее оценивать функциональное состояние микробного сообщества и повышать информативность разработанной модели.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЧС -африканская чума свиней;

АРГ - гены антибиотикорезистентности;

ВЭДС - вирус эпидемической диареи свиней;

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт;

иЖКТ - искусственный желудочно-кишечный тракт;

ИКС - искусственная кишечная среда;

КОЕ - колониеобразующая единица;

КЦЖК - короткоцепочечные жирные кислоты;

ОМЧ - общее микробное число;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

РНК - рибонуклеиновая кислота;

ЭИК - эффективность использования корма;

ОПК - остаточное потребление корма;

OTU - операционная таксономическая единица;

FDR - контроль ложных открытий, false discovery rate;

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute;

MALDI-TOF - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с
временапролетной масс-спектрометрией;

LC-MS/MS - жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией;

GC-MS - газовая хроматография с масс-спектрометрией;

UPLC - ультраэффективная жидкостная хроматография;

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes;

MAG - геном, собранный из метагенома, metagenome-assembled genome;

LEfSe - линейный дискриминантный анализ размера эффекта, linear discriminant
analysis effect size;

MRS - de Man, Rogosa and Sharpe agar;

PEA - phenylethyl alcohol agar;

BS - Bifidobacterium selective agar;

SHIME - Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem;

TIM - TNO gastrointestinal model;

PolyFermS - Polyfermentor intestinal model;

PICRUSt - прогнозирование функционального потенциала микробных сообществ по данным 16S рРНК, Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States;

GPCR - рецепторы, сопряженные с G-белком, G protein-coupled receptors;

ECSIM - Environmental Control System for Intestinal Microbiota.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ современного состояния проблемы использования антибиотиков в качестве кормовой добавки / Н. В. Черкашина, Л. И. Дроздова, В. Л. Махортов, П. Г. Васильев, М. Г. Щербаков, Л. В. Демина, А. А. Ильязов, М. С. Сирик // Аграрный вестник Урала. – 2011. – №. 3. – С. 39-42.
2. Вагапов, Ф. Ф. Продуктивные качества бычков симментальской породы при потреблении препарата Ветоспорин / Ф. Ф. Вагапов, А. И. Семерикова, Х. Х. Тагиров // Животноводство и кормопроизводство. – 2017. – №. 4 (100). – С. 110-117.
3. Вагапов, Ф. Ф. Влияние препарата Ветоспорин Ж на потребление и переваримость питательных веществ рационов бычков / Ф. Ф. Вагапов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – №. 6 (68). – С. 154-157.
4. ГОСТ 28085-2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности. - М.: Стандартинформ. 2014. - 26 с.
5. Изучение реологических свойств искусственной кишечной среды для применения в системе имитации пищеварительного тракта свиньи / Ю. А. Тихменева (Ярушникова), С. К. Шебеко, С. Н. Головин; Г. Ю. Дробот; А. М. Ермаков // Труды КубГАУ, - 2025. - №7 – С. 233-240. doi: 10.21515/1999-1703-123-233-240.
6. Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III-IV групп патогенности / И.В. Чеботарь, С.В. Поликарпова, Ю.А. Бочарова, Н.А. Маянский // Лабораторная служба. – 2018. – Т. 7. - №2. – С. 78 - 86.
7. Костенко, О. В. Свиноводство России: параметры рынка и тренды развития / О. В. Костенко, Е. Н. Васенина // Аграрное образование и наука. – 2019. – №. 2. – С. 21.

8. Коррекция дисбиоза кишечного микробиоценоза свиней при моделировании в системе имитации желудочно-кишечного тракта/ Ярушникова Ю. А., Головин С. Н., Седова Д. А., Ханукаев М. М., Шебеко С. К., Тресницкий С. Н., О.А. Манжурина, Е.В. Михайлов // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2026 - № 3(36).
9. Мазанко М. С., Брень А. Б., Рудой Д. В., Мальцева Т. А., Мазанко Е. В., Чикиндас М. Л. Состав искусственной кишечной среды для исследования микробиоты слепой кишки курицы: пат. RU 2772350 С1. - 2022. - Бюл. №14. - Заявл. 18.09.2021; опубли. 19.05.2022. - МПК C12N 1/20, G09B 23/36.
10. Моделирование кишечной микробиоты свиньи *in vitro* в автоматизированной системе имитации желудочно-кишечного тракта/ Ю.А. Тихменева (Ярушникова), С.Н. Головин, Д.А. Седова, М.М. Ханукаев, Г.Ю. Дробот, А.В. Алешукина, С.К.Шебеко // Аграрная наука. - 2026. – Т. 408 - №7- С. 31–40. doi: 10.32634/0869-8155-2026-408-07-31-40.
11. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. - М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.- 91 с.
12. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.- 67 с.
13. Новые подходы к разработке биологически активной добавки на основе метаболитов *Bifidobacterium bifidum* / В. С. Попов, Г. А. Свазлян, Н. М. Наумов, Н.В. Воробьева, А.Ю. Королева // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 5. – С. 130-135.
14. Оптимизация прототипа системы искусственного желудочно-кишечного тракта свиньи / М. М. Ханукаев, Е. А. Портнова, М. Я. Ярамышев, К. А. Мороз // Методы, средства и технологии получения и обработки измерительной информации ("Шлядинские чтения - 2025") : Материалы XVII Международной научно-технической конференции с элементами

- научной школы и конкурсом научно-исследовательских работ для обучающихся и молодых ученых, Пенза, 06–07 ноября 2025 года. – Пенза: Пензенский государственный университет, 2025. – С. 88-91.
- 15.Плаксин, И.Е. Тенденции и перспективы развития свиноводства в России / И.Е. Плаксин, С.И. Плаксин, А.В. Трифанов // АгроЭкоИнженерия. – 2022. – №. 1 (110). – С. 155-168.
 - 16.Полянская, А. И. Гистологические закономерности желудка поросят породы йоркшир в возрастном аспекте/ А.И. Полянская, М. В. Щипакин //Международный вестник ветеринарии. – 2023. – №. 2. – С. 248-253.
 - 17.Портнова, Е. А. Разработка автоматизированной модульной системы имитации желудочно-кишечного тракта свиньи для оценки кормов в агропромышленном комплексе / Е. А. Портнова // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2026. – № 217. – С. 396-418. – DOI 10.21515/1990-4665-217-035.
 - 18.Пробиотики в животноводстве / Левахин В. И., Ласыгина Ю. А., Харламов А. В., Ворошилова Л. Н. //Животноводство и кормопроизводство. – 2013 – Т. 1. - № 79. - с. 7-10.
 - 19.Пузырников, А.В. Сравнительная морфология органов желудочно-кишечного тракта свиней фермерского хозяйства и промышленного предприятия: диссертация ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.01 / Пузырников Александр Вячеславович; [Место защиты: ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»]. — Екатеринбург, 2020. — 217 с.
 - 20.Разработка искусственной кишечной среды для in vitro моделирования микробиоты свиней / Тихменева (Ярушникова) Ю. А., Шебеко С. К., Пименов Н. В., Тресницкий С. Н.// Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2026 - Т.1 – С.125-134.
 - 21.Рассолов, С.Н. Химический состав мяса молодняка свиней на откорме при введении препаратов селена и йода в сочетании с пробиотиком/ С. Н.

Рассолов, А. М. Еранов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета – 2012. – Т.92. - № 6. – С. 60-62.

22. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025620190 Российская Федерация. База данных качественного состава нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта *Sus scrofa domesticus* : заявл. 11.12.2024 : опубл. 13.01.2025 / С. К. Шебеко, Г. Ю. Дробот, Ю. А. Тихменева (Ярушникова) [и др.]; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Донской государственный технический университет».
23. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2026622310 Российская Федерация. База данных физико-химических параметров содержимого ЖКТ животных (жвачных, моногастричных и птиц): заявл. 29.04.2026 : опубл. 22.05.2026 / Ю. А. Тихменева (Ярушникова), С. К. Шебеко, В.В. Долгов; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Донской государственный технический университет».
24. Стрептококкоз в промышленном свиноводстве. Новые подходы к решению проблемы/ М. Парини, В. Гречишников, А. Панин, М. Мороз // Эффективное животноводство. – 2022. – №. 6 (181). – С. 44-46.
25. Тихменева (Ярушникова), Ю. А. Изучение сообществ кишечной микробиоты свиньи с использованием искусственной кишечной среды / Ю. А. Тихменева (Ярушникова) // Ветеринария Северного Кавказа. – 2025. – № 11. – С. 387-396. – doi 10.24412/cl-37120-2025-11-387-396.
26. Тихменева (Ярушникова), Ю. А. Возможности применения универсальной кишечной среды в системах имитации ЖКТ животных для сельскохозяйственных исследований / Ю. А. Тихменева (Ярушникова) // Молодежь в АПК : Сборник научных трудов V Юбилейного международного форума, Ростов-на-Дону, 10–17 ноября 2025 года. – Ростов-на-Дону: ООО "ДГТУ-Принт", 2025. – С. 137-138. doi:10.23947/young.2025.137-138.

- 27.Тихменева (Ярушникова), Ю. А. Перспективы изучения сообществ кишечной микробиоты свиньи с использованием искусственной кишечной среды в системе имитации пищеварительного тракта / Ю. А. Тихменева (Ярушникова) // Инновационные технологии в науке и образовании (Конференция "ИТНО 2025") : Сборник научных трудов XIII Международной научно-практической конференции, с. Дивноморское, 08–14 сентября 2025 года. – Ростов-на-Дону: ООО "ДГТУ-Принт", 2025. – С. 59-60. doi: 10.23947/itse.2025.59-60.
- 28.Тихменева (Ярушникова), Ю. А. Анализ метагеномики кишечной микрофлоры, воспроизведенной в искусственном ЖКТ / Ю. А. Тихменева (Ярушникова) // Всероссийская научная школа "Медицина молодая": Сборник аннотаций работ конкурса, Москва, 04 декабря 2024 года. – Москва: Международный фонд развития биомедицинских технологий им. В.П. Филатова, 2024. – С. 181.
- 29.Тихменева (Ярушникова), Ю. А. Анализ метагеномики кишечной микрофлоры, воспроизведенной в искусственном ЖКТ / Ю. А. Тихменева (Ярушникова) // Агропоколение: наука, практика, инновации: Сборник статей по материалам научно-практической конференция, Краснодар, 21 октября 2025 года. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, 2025. – С. 506-507.
- 30.Тихменева (Ярушникова) Ю.А. Воспроизведение кишечной микробиоты животных в искусственных условиях/ Ю.А. Тихменева (Ярушникова)// Сборник тезисов Международной конференции для молодых ученых «Генетические технологии в биомедицине». 25 сентября 2025 г.,- Москва, ИБР РАН.- С.68.
- 31.Тихменева (Ярушникова), Ю.А. Биоинформатическая оценка воспроизводимости кишечной микробиоты кур при *in vitro*-моделировании/ Ю.А. Тихменева (Ярушникова), И.В. Попов, А.М. Ермаков// Биотехнология – 2026 – Т. 42- № 3. – С. 115-129.

32. Ханукаев, М.М. Разработка прототипа модульной секции искусственного желудочно-кишечного тракта свиньи /М. М. Ханукаев, С. К. Шебеко, М. Я. Ярамышев // Инновационные технологии в науке и образовании: сборник научных трудов XII Международной научно-практической конференции, с. Дивноморское, 02–08 сентября 2024 года. – Ростов-на-Дону: Общество с ограниченной ответственностью "ДГТУ-ПРИНТ", 2024. – С. 75-77. – DOI 10.23947/itse.2024.75-77.
33. Шебеко, С. К. Искусственные пищеварительные системы в медико-биологических исследованиях: история, опыт и перспективы применения / С. К. Шебеко, Ю. А. Тихменева (Ярушникова), А. М. Ермаков // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2024. – № 114. – С. 283-301. – doi: 10.21515/1999-1703-114-283-301.
34. Шебеко, С. К. Разработка унифицированной кишечной среды для микробиологических исследований в ветеринарной медицине / С. К. Шебеко, Ю. А. Тихменева (Ярушникова), К. В. Сандулян, А. М. Ермаков // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 4. – С. 26-34. – doi: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.26.
35. Шевяков, А. Н. Метод скрининга кормовых добавок по их способности сорбировать микотоксины *in vitro* / А. Н. Шевяков, Н. Н. Гогина // Комбикорма. – 2023. – № 11. – С. 49-52. – doi 10.25741/2413-287X-2023-11-4-211.
36. A new *in vitro* model of the adult pig colon microbiome: application to the study of feed ingredients/ C. Durif, S. Denis, N. Lemoine, C. Deschamps, O. Uriot, M. Brun, D. Guillou, S. Blanquet-Diot // *Animal Microbiome*. – 2025. – Vol. 7. – №. 1. – P. 100.
37. Alberdi, A. Diversity and compositional changes in the gut microbiota of wild and captive vertebrates: a meta-analysis / A. Alberdi, G. Martin Bideguren, O. Aizpurua // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – №. 1. – P. 22660. doi: 10.1038/s41598-021-02015-6

38. Alpers, D. H. Separation and isolation of rat and human intestinal β -galactosidases / D. H. Alpers // *Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – Vol. 244. – №. 5. – P. 1238-1246.
39. Alpers, D. H. Protein synthesis by rat intestinal mucosa: The role of ribonuclease / D. H. Alpers, K. J. Isselbacher // *Journal of Biological Chemistry*. – 1967. – Vol. 242. – №. 23. – P. 5617-5622.
40. Altamirano, M. Alkaline secretion produced by intra-arterial acetylcholine / M. Altamirano // *The Journal of Physiology*. – 1963. – Vol. 168. – №. 4. – P. 787-803. doi: 10.1113/jphysiol.1963.sp007223.
41. Alteration of the Gut Microbiota in Pigs Infected with African Swine Fever Virus / Y.S. Ko, D. Tark, S.H. Moon, D.M. Kim, T.G. Lee, D.Y. Bae, S.Y. Sunwoo, Y. Oh, H.S. Cho // *Veterinary Sciences*. – 2023. – Vol. 10. - № 5. – P. 360. – doi: 10.3390/vetsci10050360.
42. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review / U. Gadde, W. H. Kim, S. T. Oh, H. S. Lillehoj // *Animal health research reviews*. – 2017. – Vol. 18. – №. 1. – C. 26-45.
43. Alvarado, F. D-xylose active transport in the hamster small intestine / F. Alvarado // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*. – 1966. – Vol. 112. – №. 2. – P. 292-306. doi: 10.1016/0926-6585(66)90328-1
44. Alvarado, F. Transport of sugars and amino acids in the intestine: evidence for a common carrier / F. Alvarado // *Science*. – 1966. – Vol. 151. – №. 3713. – P. 1010-1013. doi: 10.1126/science.151.3713.1010
45. Alvarado, F. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine, in vitro / F. Alvarado, R. K. Crane // *Biochimica et biophysica acta*. – 1962. – Vol. 56. – P. 170-172. doi: 10.1016/0006-3002(62)90543-7.
46. Analysis of antibiotic resistance genes in pig feces during the weaning transition using whole metagenome shotgun sequencing / G. B. Keum, E. S. Kim, J. Cho, M. Song, K. K. Oh, J. H. Cho, S. Kim, H. Kim, J. Kwak, H. Doo, S. Pandey, H. B.

- Kim , J.H. Lee // Journal of Animal Science and Technology. – 2023. – Vol. 65. – №. 1. – P. 175.
- 47.Anderson D. E., Rings M. Current veterinary therapy: food animal practice. – Elsevier Health Sciences, 2008. – 715 p.
- 48.Pi Y. et al. Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota and microbial fermentation in protein parallel the changes in host nitrogen metabolism of growing pigs //Animal. – 2019. – T. 13. – №. 2. – C. 262-272.
- 49.Argenzio, R.A. Functions of the equine large intestine and their interrelationship in disease/ R.A. Argenzio // Cornell Vet. - 1975. – Vol.65. - №3. – P.303-330.
- 50.Arroyo, L. G. Potential role of Clostridium difficile as a cause of duodenitis-proximal jejunitis in horses / L. G. Arroyo, H. R. Stämpfli, J. S. Weese //Journal of medical microbiology. – 2006. – Vol. 55. – №. 5. – P. 605-608. doi: 10.1099/jmm.0.46334-0.
- 51.Aschaffenburg, R. The Nutritive Value of Colostrum for the Calf: 3. Changes in the Serum Protein of the Newborn Calf following the Ingestion of Small Quantities of the Non-fatty Fraction / R. Aschaffenburg //British Journal of Nutrition. – 1949. – Vol. 3. – №. 2-3. – P. 200-204. doi: 10.1079/bjn19490028.
- 52.Advances in the isolation, cultivation, and identification of gut microbes / M. Q. Xu, F. Pan, L. H. Peng, Y. S. Yang //Military Medical Research. – 2024. – Vol. 11. – №. 1. – P. 34.
- 53.An evaluation of the Gaspak system in the culture of anaerobic bacteria / J. G. Collee, B. Watt, E. B. Fowler, R. Brown //Journal of Applied Microbiology. – 1972. – Vol. 35. – №. 1. – P. 71-82.
- 54.Analysis of the gut bacterial communities in beef cattle and their association with feed intake, growth, and efficiency / P. R. Myer, H. C. Freetly, J. E. Wells, T. P. L. Smith., L. A. Kuehn //Journal of animal science. – 2017. – Vol. 95. – №. 7. – P. 3215-3224.
- 55.Artificial gastrointestinal models for nutraceuticals research-Achievements and challenges: A practical review / A. Gościński, P. Eder, J. Walkowiak, Cielecka- J. Piontek //Nutrients. – 2022. – Vol. 14. – №. 13. – P. 2560.

56. Bartley, E. E. An analysis of the bloat complex and progress toward its prevention / E. E. Bartley // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. – 1965. – Vol. 147. – №. 12. – P. 1397-1402.
57. Barnett, D. R. A review of the comparative anatomy of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*) and its relevance to translational research in abdominal transplantation / D.R. Barnett, R. Bhattacharjya, S. Bhattacharjya // *Laboratory Animals*. – 2026. – Vol. 60. – №. 2. – P. 131-143.
58. Batt, R. M. A new test for the diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency in the dog / R. M. Batt, B. M. Bush, T. J. Peters // *Journal of Small Animal Practice*. – 1979. – Vol. 20. – №. 3. – P. 185-192. doi: 10.1111/j.1748-5827.1979.tb07029.x.
59. Batt, R. M. Morphological and biochemical studies of a naturally occurring enteropathy in the Irish setter dog: a comparison with coeliac disease in man / R. M. Batt, M. W. Carter, L. McLean // *Research in veterinary science*. – 1984. – Vol. 37. – №. 3. – P. 339-346.
60. Bedford, M. R. Exogenous enzymes for pigs and poultry / M. R. Bedford, H. Schulze // *Nutrition research reviews*. – 1998. – Vol. 11. – №. 1. – P. 91-114. doi:10.1079/NRR19980007
61. Bile acid metabolism by colonic bacteria in continuous culture: effects of starch and pH / S. U. Christl, P. Bartram, A. Paul, E. Kelber, W. Scheppach, H. Kasper // *Annals of nutrition and metabolism*. – 1997. – Vol. 41. – №. 1. – P. 45-51.
62. Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells / C. Campbell, P.T. McKenney, D. Konstantinovskiy, O.I. Isaeva, M. Schizas, J. Verter, C. Mai, W.B. Jin, C.J. Guo, S. Violante, R.J. Ramos, J.R. Cross, K. Kadaveru, J. Hambor, A.Y. Rudensky // *Nature*. – 2020. – Vol. 581 - №7809 – P. 475-479. doi: 10.1038/s41586-020-2193-0.
63. Bacteria Boost Mammalian Host NAD Metabolism by Engaging the Deamidated Biosynthesis Pathway / I. Shats, J.G. Williams, J. Liu, M.V. Makarov, X. Wu, F.B. Lih, L.J. Deterding, C. Lim, X. Xu, T.A. Randall, E. Lee, W. Li, W. Fan, J.L. Li, M. Sokolsky, A.V. Kabanov, L. Li, M.E. Migaud, J.W. Locasale, X. Li // *Cell Metab*. – 2020. – Vol. 31 - №3 – P. 564-579. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.001.

64. Biotin-mediated growth and gene expression in *Staphylococcus aureus* is highly responsive to environmental biotin / J. Satiaputra, B. A. Eijkelkamp, C. A. McDevitt, K. E. Shearwin, G. W. Booker, S. W. Polyak // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2018. – Vol. 102 - №8 – P. 3793-3803. doi: 10.1007/s00253-018-8866-z.
65. Changes in the Swine Gut Microbiota in Response to Porcine Epidemic Diarrhea Infection / H.W. Koh, M.S. Kim, J.S. Lee, H. Kim, S.J. Park // *Microbes and Environments*. – 2015. – Vol. 30. - № 3. – P. 284-287. doi: 10.1264/jsme2.ME15046.
66. Changes of gut microbiota and its correlation with short chain fatty acids and bioamine in piglets at the early growth stage / R. Qi , X. Qiu, L. Du, J. Wang, Q. Wang , J. Huang, Z. Liu // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2021. – Vol. 7. – P. 617259
67. Characterizing core microbiota and regulatory functions of the pig gut microbiome / J. Hu, J. Chen, L. Ma, Q. Hou, Y. Zhang, X. Kong, X. Huang, Z. Tang, H. Wei, X. Wang, X. Yan // *The ISME Journal*. – 2024. – Vol. 18. – №. 1. – P. wrad037.
68. Combination of bacteriophage–probiotics alleviates intestinal barrier dysfunction by regulating gut microbiome in a chick model of multidrug-resistant *Salmonella* infection / Y. Choi, A. Kang, E. Seo, D.J. Lee, J. Park, Y. Kim, K. Yu, C.H. Yun, K.B. Jang, W.K. Kim, K. Shim, D. Kang, Y. Kim // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. – 2026. – Vol. 17. – №. 1. – P. 14.
69. Common occurrence of antibacterial agents in human intestinal microbiota / F. Drissi, S. Buffet, D. Raoult, V. Merhej // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 441. doi: 10.3389/fmicb.2015.00441.
70. Comparison of Fecal Microbiota of Mongolian and Thoroughbred Horses by High-throughput Sequencing of the V4 Region of the 16S rRNA Gene/ Y. Zhao, B. Li, D. Bai, J. Huang, W. Shiraigo, L. Yang, Q. Zhao, X. Ren, J. Wu, W. Bao, M. Dugarjaviin // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. – 2015. – Vol. 29. – №. 9. – P. 1345- 1352. doi: 10.5713/ajas.15.0587.

71. Comprehensive analysis of pig feces metabolome by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry in high resolution mode: Influence of sample preparation on the identification coverage / M. A. López-Bascón, M. Calderón-Santiago, H. Argüello, L. Morera, J. J. Garrido, F. Priego-Capote // *Talanta*. – 2019. – Vol. 199. – P. 303-309
72. Composition and function of gut microbiome: from basic omics to precision medicine/ Y. Ma, L. Wang, H. Hu, A. R. Shieh, E. Li, D. He, L. He, Z. Liu, T. M. Paing, X. Chen, Y Cao // *Genes*. - 2026. – Vol. 17. -№. 1. – P. 116.
73. Culturing the human microbiota and culturomics/ J.C. Lagier, G. Dubourg, M. Million, F. Cadoret, M. Bilen, F. Fenollar, A. Levasseur, J.M. Rolain, P.E. Fournier D. Raoult // *Nature Reviews Microbiology*. - 2018. – Vol. 16. – №. 9. – P. 540-550.
74. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B.J. Callahan, P.J. McMurdie, M.J. Rosen , A. W. Han, A. J. A. Johnson, S. P. Holmes // *Nature Methods*. – 2016. – Vol. 13, № 7. – P. 581-583.
75. Deep investigating the changes of gut microbiome and its correlation with the shifts of host serum metabolome around parturition in sows / H. Fu, M. He, J. Wu, Y. Zhou, S. Ke, Z. Chen, Q. Liu, M. Liu, H. Jiang, L. Huang, C. Chen // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 729039.
76. Decoding the intestinal microbiota repertoire of sow and weaned pigs using culturomic and metagenomic approaches/ D. Mun, H. Kim, M. Shin, S. Ryu, M. Song, S. Oh, Y. Kim // *Journal of Animal Science and Technology*. – 2021. – Vol. 63. – №. 6. – P. 1423
77. Decreased nutrient digestibility due to viscosity is independent of the amount of dietary fibre fed to growing pigs / Y. T. Hung, J. Zhu, G. C. Shurson, P. E. Urriola, M. Saqui-Salces // *British Journal of Nutrition*. – 2022. – Vol. 127. – №. 2. – P. 177-187.
78. Development of culture methods capable of culturing a wide range of predominant species of intestinal bacteria / R. Hirano, I. Nishita, R. Nakai, A. Bito, R. Sasabe, S. Kurihara // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1056866.

79. Delaney, M. L. Evaluation of the AnaeroPack system for growth of clinically significant anaerobes / M. L. Delaney, A. B. Onderdonk // *Journal of clinical microbiology*. – 1997. – Vol. 35. – №. 3. – P. 558-562.
80. Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI / E. Barroso, C. Cueva, C. Peláez, M. C. Martínez-Cuesta, T. Requena // *LWT-Food Science and Technology*. – 2015. – Vol. 61. – №. 2. – P. 283-289.
81. Digestive parameters and gut microbiota load and composition along the in vivo piglet gastrointestinal tract / C. Rotsaert, Y. Minnebo, C. Duysburgh, L. Liu, K. K. Mahalak, J. Firman, L. M. Mattei, A. M. Moustafa, K. Bittinger, W. Hu, M. Marzorati, J. Michiels, T. Van de Wiele // *Journal of Animal Science*. – 2025. – Vol. 103. – P. skaf107
82. Distribution of Lignin, Hemicellulose, and Arabinogalactan Protein in Hemp Phloem Fibers / S. Kiyoto, A. Yoshinaga, E. Fernandez-Tendero, A. Day, B. Chabbert, K. Takabe // *Microscopy and Microanalysis*. – 2018. – Vol. 24 - №4 – P. 442-452. doi: 10.1017/S1431927618012448.
83. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness/ A. Cotillard, S.P. Kennedy, L.C. Kong, E. Prifti, N. Pons, E. Le Chatelier, M. Almeida, B. Quinquis, F. Levenez, N. Galleron, S. Gougis, S. Rizkalla, J.M. Batto, P. Renault // *Nature*. – 2013. – Vol. 500. – №. 7464. – P. 585-588.
84. Dietary amylose and amylopectin ratio changes starch digestion and intestinal microbiota diversity in goslings / Z. Yang, C. Xu, W. Wang, X. Xu, H.M. Yang, Z.Y. Wang, S.P. Rose, V. Pirgozliev // *British Poultry Science*. – 2022. – Vol. 63. – №. 5. – P. 691-700. doi: 10.1080/00071668.2022.2079398.
85. Differences in Metabolism of Ellagitannins by Human Gut Microbiota ex Vivo Cultures / J.P. Piwowarski, S. Granica, J. Stefańska, A.K. Kiss // *Journal of natural products*. – 2016. – Vol. 79 - №12. – P. 3022-3030. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00602.
86. D'sa, A. A. J. B. Direct inhibition of gastric acid by growth-hormone release-inhibiting hormone in dogs / A.A.J.B. D'sa, S. R. Bloom, J. H. Baron // *The Lancet*.

- 1975. – Vol. 305. – №. 7912. – P. 886-887. doi: 10.1016/s0140-6736(75)91685-2.
87. Dufourny, S. Development of a gastrointestinal model to study the interest of apple pomace during weaning of piglets / S. Dufourny– Universite de Liege (Belgium), 2022. – 234.
88. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities / K. C. Mountzouris, P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr, K. Fegeros // *Poultry science*. – 2007. – Vol. 86. – №. 2. – C. 309-317.
89. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice / A.L. Goodman, G. Kallstrom, J.J. Faith, A. Reyes, A. Moore, G. Dantas, J.I. Gordon // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – №. 15. – P. 6252-6257. doi: 10.1073/pnas.1102938108.
90. Effect of dietary supplementation of xylanase on apparent ileal digestibility of nutrients, viscosity of digesta, and intestinal morphology of growing pigs fed corn and soybean meal based diet / A. A. Passos, I. Park, P. Ferket, E. von Heimendahl, S. W. Kim // *Animal Nutrition*. – 2015. – Vol. 1. – №. 1. – P. 19-23.
91. Effects of lactose on colon microbial community structure and function in a four-stage semi-continuous culture system / H. A. MAeKIVUOKKO, M. T. Saarinen, A. C. Ouwehand, N. E. Rautonen // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2006. – Vol. 70. – №. 9. – P. 2056-2063.
92. Extensive identification of serum metabolites related to microbes in different gut locations and evaluating their associations with porcine fatness / Q. Liu, M. He, Z. Zeng, X. Huang, S. Fang, Y. Zhao, S. Ke, J. Wu, Y. Zhou, X. Xiong, Z. Li, H. Fu, L. Huang, C. Chen // *Microbial Biotechnology*. – 2023. – Vol. 16. – №. 6. – P. 1293-1311

93. Graham, H. An in vitro method for studying digestion in the pig: 2. Comparison with in vivo ileal and faecal digestibilities/ H. Graham, W. Löwgren, P. Åman //British Journal of Nutrition. – 1989. – Vol. 61. – №. 3. – P. 689-698.
94. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes / M. Albertsen, P. Hugenholtz, A. Skarszewski, K.L. Nielsen, G.W. Tyson, P.H. Nielsen //Nature biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – №. 6. – P. 533-538. doi: 10.1038/nbt.2579.
95. Gastrointestinal simulation model TWIN-SHIME shows differences between human urolithin-metabotypes in gut microbiota composition, pomegranate polyphenol metabolism, and transport along the intestinal tract / R. García-Villalba, H. Vissenaekens, J. Pitart, M. Romo-Vaquero, J.C. Espín, C. Grootaert, M.V. Selma, K. Raes, G. Smagghe, S. Possemiers, J. Van Camp, F.A. Tomas-Barberan //Journal of agricultural and food chemistry. – 2017. – Vol. 65. – №. 27. – P. 5480-5493.
96. Gastrointestinal Microbiota and Their Manipulation for Improved Growth and Performance in Chickens / S. Fathima, R. Shanmugasundaram, D. Adams, R.K. Selvaraj // Foods. - 2022. - Vol.11. - №10. - P. 1401.
97. Gut microbiota is a major contributor to adiposity in pigs / H. Yang, Y. Xiang, K. Robinson, J. Wang, G. Zhang, J. Zhao, Y. Xiao //Frontiers in microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 3045
98. Gut microbiome-produced metabolites in pigs: a review on their biological functions and the influence of probiotics / R. Vasquez, J. K. Oh, J. H. Song, D. K. Kang //Journal of Animal Science and Technology. – 2022. – Vol. 64. – №. 4. – P. 671.
99. Intestinal microbiota dynamics in piglets: the interplay with swine enteric coronavirus infections and implications for disease control / Y. Liu, B. Dong, Y.L. Yang, Y.Q Zhang., Y. Zhang, D. Pan, E.Z. Du, S.J. Zhu, B. Wang, Y.W. Huang // Animal Microbiome. – 2025. – Vol. 7. - № 1. – P. 107. – doi: 10.1186/s42523-025-00472-2.

100. Holdeman, L. V. Roll-tube techniques for anaerobic bacteria / L. V. Holdeman, W. E. C. Moore //The American Journal of Clinical Nutrition. – 1972. – Vol. 25. – №. 12. – P. 1314-1317.
101. Hornbuckle, W. E., Tennant B. C. Gastrointestinal function. Clinical biochemistry of domestic animals / W. E. Hornbuckle, B. C. Tennant – Academic Press, 1997. – P. 367-406.
102. Identification of the relationship between the gut microbiome and feed efficiency in a commercial pig cohort / H. Jiang, S. Fang, H. Yang, C. Chen //Journal of animal science. – 2021. – Vol. 99. – №. 3. – P. skab045
103. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli / P. Van den Abbeele, S. Roos, V. Eeckhaut, D.A. MacKenzie, M. Derde, W. Verstraete, M. Marzorati, S. Possemiers, B. Vanhoecke, F. Van Immerseel, T. Van de Wiele //Microbial biotechnology. – 2012. – Vol. 5. – №. 1. – P. 106-115.
104. Impact of plant sterols enrichment dose on gut microbiota from lean and obese subjects using TIM-2 in vitro fermentation model / M. Cuevas-Tena, A. Alegria, M. J. Lagarda, K. Venema //Journal of Functional Foods. – 2019. – Vol. 54. – P. 164-174.
105. Impact of the gut microbiota–metabolite axis on intestinal fatty acid absorption in huainan pigs / J. Wang, L. Zhu, Y. Wang, Q. Ma, X. Yan, M. Li, B. Xing //Microorganisms. – 2025. – Vol. 13. – №. 7. – P. 1609.
106. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens / H.U. Rehman, W. Vahjen, W.A. Awad, J. Zentek //Archives of animal nutrition. - 2007. - Vol. 61. - №. 5. - P. 319-335.
107. In vitro and in vivo fermentation models to study the function of dietary fiber in pig nutrition / W. Huangfu, S. Cao, S. Li, S. Zhang, M. Liu, B. Liu, X. Zhu, Y. Cui, Z. Wang, J. Zhao, Y. Shi //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2024. – Vol. 108. – №. 1. – P. 314.
108. In vitro continuous fermentation model (PolyFermS) of the swine proximal colon for simultaneous testing on the same gut microbiota / S. A. Tanner, A. Zihler

- Berner, E. Rigozzi, F. Grattepanche, C. Chassard, C. Lacroix //PloS one. – 2014. – Vol. 9. – №. 4. – P. e94123.
109. Kerr, B. J. Strategies to improve fiber utilization in swine / B. J. Kerr, G. C. Shurson //Journal of Animal Science and Biotechnology. – 2013. – Vol. 4. – №. 1. – P. 11. doi.org/10.1186/2049-1891-4-11
 110. Kim, H. Y. Development and application of a multi-step porcine in vitro system to evaluate feedstuffs and feed additives for their efficacy in nutrient digestion, digesta characteristics, and intestinal immune responses / H. Y. Kim, J. O. Moon, S. W. Kim //Animal Nutrition. – 2024. – Vol. 17. – P. 265-282. doi: 10.1016/j.aninu.2024.01.006.
 111. Kim, H. B. The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing/ H. B. Kim, R. E. Isaacson //Veterinary microbiology. – 2015. – Vol. 177. – №. 3-4. – P. 242-251.
 112. Kanehisa, M. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes / M. Kanehisa, S. Goto //Nucleic acids research. – 2000. – Vol. 28. – №. 1. – P. 27-30.
 113. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences / H. Li // Bioinformatics. – 2018. – Vol. 34, № 18. – P. 94-100.
 114. Macfarlane, G. T. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon / G. T. Macfarlane, S. Macfarlane, G. R. Gibson //Microbial ecology. – 1998. – Vol. 35. – №. 2. – P. 180-187.
 115. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads / M. Martin // EMBnet.journal. – 2011. – T. 17. – № 1. – P. 10-16.
 116. Maternal amoxicillin affects piglets colon microbiota: microbial ecology and metabolomics in a gut model / L. Nissen, C. Aniballi, F. Casciano, A. Elmi, D. Ventrella, A. Zannoni, A. Gianotti, M. L. Bacci //Applied microbiology and biotechnology. – 2022. – Vol. 106. – №. 22. – P. 7595-7614.

117. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data / D. H. Huson, S. Beier, I. Flade, A. Górski, M. El-Hadidi, S. Mitra, H.J. Ruscheweyh, R. Tappu // *PLOS Computational Biology*. – 2016. – Vol. 12. - № 6. – P. 57-62.
118. Microbiological diversity, formation, ecological role and research methods of the pig gut microbiota / D. A. Sedova, S. N. Golovin, S. K. Shebeko, A. M. Ermakov // *Ecological genetics*. – 2025. – Vol. 23. – №. 2. – P. 173-184.
119. Microbiological sampling of surfaces / M.S. Favero, J.J. McDade, J.A. Robertsen, R.K. Hoffman, R.W. Edwards // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1968. – Vol. 31 - №3 – P. 336-343. doi: 10.1111/j.1365-2672.1968.tb00375.x.
120. Minekus, M. The TNO gastro-intestinal model (TIM) / M. Minekus // *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. – 2015. – P. 37-46.
121. Molly, K. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem / K. Molly, M. Vande Woestyne, W. Verstraete // *Applied microbiology and biotechnology*. – 1993. – Vol. 39. – №. 2. – P. 254-258.
122. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis / E. Elinav, T. Strowig, A.L. Kau, J. Henao-Mejia, C.A. Thaiss, C.J. Booth, D.R. Peaper, J. Bertin, S.C. Eisenbarth, J.I. Gordon, R.A. Flavell // *Cell*. – 2011. – Vol. 145. – №. 5. – P. 745-757. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.022
123. Nosaka, K. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Nosaka // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2006. – Vol. 72 - №1 – P. 30-40. doi: 10.1007/s00253-006-0464-9.
124. 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, S. M. Gifford, A. N. Septer, K. L. Visick // *MBio*. – 2021. – Vol. 12 - №5. doi: 10.1128/mBio.02034-21.

125. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview / M.A.K. Azad, M. Sarker, T. Li, J. Yin //BioMed research international. – 2018. – Vol. 2018. – №. 1. – P. 9478630. doi: 10.1155/2018/9478630.
126. 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 Journal of Microbiology – 2011. – Vol.60 - №1 – P. 65-71.
127. Rheological and microstructural properties of porcine gastric digesta and diets containing pectin or mango powder/ P. Wu, S. Dhital, B. A. Williams, X. D. Chen, M. J. Gidley //Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 148. – P. 216-226.
128. Roediger, W. E. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man / W. E. Roediger //Gut. – 1980. – Vol. 21. – №. 9. – P. 793-798. doi.org/10.1136/gut.21.9.793.
129. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments / J.R. Swann, E.J. Want, F.M. Geier, K. Spagou, I.D. Wilson, J.E. Sidaway, J.K. Nicholson, E. Holmes //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 108. – №. 1. – P. 4523-4530. doi: 10.1073/pnas.1006734107.
130. Schaedler, R. W. Association of germfree mice with bacteria isolated from normal mice / R.W. Schaedler, R. Dubos, R. Costello //The Journal of experimental medicine. – 1965. – Vol. 122. – №. 1. – P. 77.
131. Small intestinal bacterial overgrowth and enhanced intestinal permeability in healthy beagles / R.M. Batt, E.J. Hall, L. McLean, K.W. Simpson //American Journal of Veterinary Research. – 1992. – Vol. 53. – №. 10. – P. 1935-1940.
132. Staley, J. T. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats / Staley J. T., Konopka A. //Annual review of microbiology. – 1985. – Vol. 39. – №. 1. – P. 321-346.
133. 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 Microbiology – 2021. – Vol.21 - №1 – P. 232. doi: 10.1186/s12866-021-02294-z.
134. Seung, D. Amylose in starch: towards an understanding of biosynthesis, structure and function / D. Seung // New Phytologist – 2020. – Vol.228 - №5 – P.1490-1504. doi: 10.1111/nph.16858.
 135. Structural characterization of the carbohydrate and protein part of arabinogalactan protein from *Basella alba* stem and antiadhesive activity of polysaccharides from *B. alba* against *Helicobacter pylori* / H.T.Nguyen, F.Herrmann, S. König, F. M. Goycoolea, A. Hensel // Fitoterapia. – 2022 - №157 – P.105132. doi: 10.1016/j.fitote.2022.105132
 136. Takagi, H. L-Cysteine Metabolism and Fermentation in Microorganisms / Takagi H., Ohtsu I. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2017. - №159 – P. 129-151. doi: 10.1007/10_2016_29.
 137. Tahiliani, A.G. Pantothenic acid in health and disease / A.G. Tahiliani, C.J. Beinlich // Vitam. Horm. – 1991. - №46 – P. 165-228. doi: 10.1016/s0083-6729(08)60684-6.
 138. Takahashi, T. Viscous properties of pig cecal contents and the contribution of solid particles to viscosity / T. Takahashi, T. Sakata // Nutrition. – 2004. – Vol. 20. – №. 4. – P. 377-382.
 139. The Gut Microbiome of 54 Mammalian Species / N. de Jonge, B. Carlsen, M.H. Christensen, C. Pertoldi, J.L. Nielsen // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 886252. doi: 10.3389/fmicb.2022.886252
 140. The Effects of Captivity on the Mammalian Gut Microbiome / V.J. McKenzie, S.J. Song, F. Delsuc, T.L. Prest, A.M. Oliverio, T.M. Korpita, A. Alexiev, K.R. Amato, J.L. Metcalf, M. Kowalewski, N.L. Avenant, A. Link, A. Di Fiore, A. Seguin-Orlando, C. Feh, L. Orlando, J.R. Mendelson, J. Sanders, R. Knight // Integrative and comparative biology. – 2017. – Vol. 57. – №. 4. – P. 690-704. doi: 10.1093/icb/icx090
 141. The simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®) / T. Van de Wiele, P. Van den Abbeele, W. Ossieur, S. Possemiers, M. Marzorati // The

- Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. – 2015. – P. 305-317.
142. 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, S. Vieths, M. Toda, S. Scheurer // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2021 – Vol.21 - №10 – P.43. doi: 10.1007/s11882-021-01020-z.
 143. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools / C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F. Oliver Glöckner // *Nucleic Acids Research.* – 2012. – Vol. 4. - № D1. – P. 590-596.
 144. The effect of high-molecular-weight guar gum on net apparent glucose absorption and net apparent insulin and gastric inhibitory polypeptide production in the growing pig: relationship to rheological changes in jejunal digesta / P. R. Ellis, F. G. Roberts, A. G. Low, L. M. Morgan // *British Journal of Nutrition.* – 1995. – Vol. 74. – №. 4. – P. 539-556.
 145. The, H. C. Dynamic of the human gut microbiome under infectious diarrhea / H. C. The, S. N. H. Le // *Current opinion in microbiology.* – 2022. – Vol. 66. – P. 79-85.
 146. Turner, P.V. The role of the gut microbiota on animal model reproducibility / P.V. Turner // *Animal models and experimental medicine.* – 2018. – Vol. 1. - № 2. — P.109–115.
 147. Twelve years of SAMtools and BCFtools / P. Danecek, J. K. Bonfield, J. Liddle, J. Marshall, V. Ohan, M. O. Pollard, A. Whitwham, T. Keane, S. A. McCarthy, R. M. Davies, H. Li// *GigaScience.* – 2021. – Vol. 10. - № 2. – P. 400-404.
 148. Unraveling the composition and function of pig gut microbiome / Q. Tang, X. Yin, G. Wen, Z. Luo, L. Zhang, S. Tan // *Animal Microbiome.* – 2025. – Vol. 7. –№. 1. – P. 60.

149. Van Eenennaam, A. L. Animal agriculture and the importance of agnostic governance of biotechnology / A. L. Van Eenennaam, A. E. Young // *Agriculture & Food Security*. – 2015. – Vol. 4. – №. 1. – P. 21.
150. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities / K. Molly, M. V. Woestyne, I. D. Smet, W. Verstraete // *Microbial ecology in health and disease*. – 1994. – Vol. 7. – №. 4. – P. 191-200.
151. Wei, L. Comparison of changes in gut microbiota in wild boars and domestic pigs using 16S rRNA gene and metagenomics sequencing technologies/ L. Wei, W. Zhou, Z. Zhu // *Animals*. – 2022. – Vol. 12. – №. 17. – P. 2270.
152. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* / H. Wickham. – New York, NY: Springer New York, 2009. – 268 p.
153. Weaning-associated feed deprivation stress causes microbiota disruptions in a novel mucin-containing in vitro model of the piglet colon (MPigut-IVM)/ R. Gresse, F. Chaucheyras-Durand, S. Denis, M. Beaumont, T. Van de Wiele, E. Forano E., S. BlanquetDiot // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* – 2021. – №.12. – P. 1–23. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00584-0>
154. Zinc oxide nanoparticles influence microflora in ileal digesta and correlate well with blood metabolites / Y. Feng, L. Min, W. Zhang, J. Liu, Z. Hou, M. Chu, L. Li, W. Shen, Y. Zhao, H. Zhang // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 992.

Приложение А



Рисунок А.1 – Установка иЖКТ, включающая тонкий и толстый отдел, заполненная кишечной средой, в ламинарном шкафу.



Рисунок А.2 – Приготовление базового состава искусственной кишечной среды.



Рисунок А.3 – Измерение вязкости искусственной кишечной среды на ротационном вискозиметре Thermo Scientific HAAKE Viscotester C.