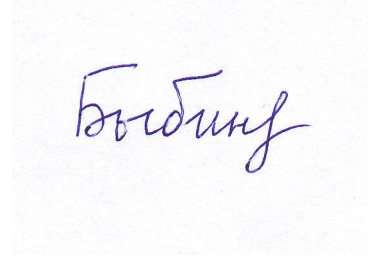


На правах рукописи



Быбин Виктор Александрович

ВЛИЯНИЕ ВЕРМИПРЕПАРАТОВ НА РАЗЛИЧНЫЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ

03.02.08 – экология (биологические науки)

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Иркутск-2012

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» и ФГБОУ ВПО НИ «Иркутский государственный технический университет».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
Стом Дэвард Иосифович

Официальные оппоненты: Данчинова Галина Анатольевна
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Института эпидемиологии и
микробиологии НЦ ПЗС РЧ СО РАМН

Хуснидинов Шарифзян Кадырович
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор, Иркутская государственная
сельскохозяйственная академия

Ведущая организация Красноярский государственный
аграрный университет

Защита состоится 24 мая 2012 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при Иркутском государственном университете на биолого-почвенном факультете Иркутского государственного университета.

Почтовый адрес: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, биолого-почвенный факультет ФГБОУ ВПО «ИГУ».

Телефон/факс: (3952)241855, e-mail: dissovet07@gmail.com, godolin@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИГУ по адресу: 664003, г. Иркутск, бул. Гагарина, 24.

Автореферат разослан «22» апреля 2012 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н., доцент



А.А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Сегодня во всём мире наблюдается бум по созданию, патентованию и выпуску новых лекарственных средств повышенной эффективности из дождевых червей (ДЧ) (патенты №: РФ – 2412593, 2359685, 2180574, 2177784, США – 20100074962; 5,128,148; 5,024,844; КНР – 200910157894 и многие другие; Chu et al, 2007; Cooper, 2010). Интерес к вермипрепаратам (ВП) обусловлен их противоопухолевой, антибактериальной, антиоксидантной, иммуногенной, а также рядом других активностей (Sun, 2003; Lee et al, 2007; Im et al, 2009; Sinha, 2010). Иммунная и ферментативная системы ДЧ подвергаются значительным флюктуациям под действием биотических и абиотических факторов (Komiyama et al., 2003; Wang et al, 2004). Это приводит к изменению антимикробных свойств ДЧ, увеличению активности их ферментов, играющих важную роль в проявлении препаратами фармацевтических свойств. В связи с тем, что для производства ВП используется живое сырьё, количество и качество биологически активных агентов, входящих в их состав, зависят от различных условий, в частности, от исходного физиологического состояния ДЧ, кормовых субстратов, используемых для выращивания червей. Исходя из вышесказанного, можно было ожидать получения более эффективных препаратов из ДЧ, подвергнутых определённым активирующим воздействиям. Поэтому столь актуальным представляется изучение действия различных факторов биотической и абиотической природы на ДЧ. Для обеспечения поиска процедур, приводящих к повышению активности ВП, крайне важно иметь простые и дешёвые методы экспрессной оценки их активности. Наличие таких методов позволило бы преодолеть основной момент, сдерживающий применение в официальной медицине самых различных комплексных многокомпонентных животных и растительных препаратов, – трудности при дозировке их активного начала. Эти приемы могут быть также использованы для контроля условий производства, хранения и эффективного применения ВП. К сожалению, на сегодня подобных способов очень мало (Яшин и др., 2004; Тимофеев и др., 2005; Стом, 2008). Недостатками существующих методов оценки активности ВП являются длительность получения ответа, дороговизна, потребность в соответственно оборудованных лабораториях.

Цель работы: изучение взаимовлияния дождевых червей и некоторых групп микроорганизмов, а также действия вермипрепаратов на различные тест объекты.

Задачи работы:

1) изучить возможность сохранения представителей ряда групп микроорганизмов в кишечнике ДЧ;

- 2) исследовать влияние инокуляции культурой *Saccharomyces cerevisiae* и препаратом «Бифидумбактерин» на численность гетеротрофных бактерий, в том числе бактерий группы кишечной палочки (БГКП), в кишечнике ДЧ;
- 3) изучить влияние *Trichoderma viride* на ДЧ;
- 4) проанализировать действие ряда биотических и абиотических факторов на иммунные свойства ДЧ;
- 5) разработать приемы повышения активности ВП и снижения бактериальной обсемененности вермисырья;
- 6) проанализировать влияние ВП на тест-организмы из различных систематических групп и предложить экспрессные, технически простые методы оценки активности ВП.

Защищаемые положения:

1. Антимикробные свойства целомической жидкости ДЧ и получаемых из них ВП усиливаются под действием некоторых биотических (инокуляции ДЧ отдельными штаммами микроорганизмов) и абиотических (охлаждение, нагревание) факторов.
2. При контаминации (инъекции *per os*, свободном скармливании) некоторые штаммы бактерий, дрожжей, микроскопических грибов могут интродуцироваться в аутомикрофлору кишечника ДЧ.
3. ВП оказывают преимущественно негативное влияние на физиологические процессы и выживаемость беспозвоночных животных, водорослей, высших водных и наземных растений.
4. Пероральная инъекция ДЧ определенными концентрациями перекиси водорода, эфирных масел и отварами лекарственных трав, а также инокуляция препаратом «Бифидумбактерин» и культурой пекарских дрожжей *S. cerevisiae* значительно снижает количество гетеротрофных бактерий, в том числе БКП, в кишечнике ДЧ без видимого вреда для организма животных.

Научная новизна. Изучена выживаемость некоторых групп микроорганизмов (*Staphylococcus* sp., *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *T. viride*, *Streptomyces* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Scenedesmus quadricauda*, *Dunaliella salina* и *Oscillatoria* sp.) в кишечнике ДЧ после их инокуляции. Исследовано усиление бактерицидных свойств целомической жидкости при инокуляции ДЧ некоторыми штаммами микроорганизмов. Впервые изучены эффекты ВП на олигохет, планарий, рачков, простейших, высшие водные и наземные растения, одноклеточные и высшие водоросли. Исследованы процессы накопления металлов-микроэлементов в ДЧ. Выяснено действие некоторых концентраций перекиси водорода, эмульсий эфирных масел, отваров лекарственных трав, инокуляции препаратом «Бифидумбактерин» и культурой пекарских дрожжей

S. cerevisiae на количество гетеротрофных бактерий, в том числе БКГП, в кишечнике ДЧ.

Практическая значимость. Разработаны методы: повышения бактерицидной активности ВП путем предварительной физической или биологической активации иммунной системы червей (патент РФ № 2322993); увеличения содержания в ВП микроэлементов (патент РФ № 2414918); снижения бактериальной обсемененности вермисырья (патент РФ № 2336084); экспрессной интегральной оценки биологической активности ВП (патенты РФ № 2377561, 2413219, 2415419); усиления способности ДЧ утилизировать целлюлозу. Полученные материалы могут быть использованы при производстве, контроле качества, поиске оптимальных лечебных доз не только ВП, но и других многокомпонентных лекарственных средств животного и растительного происхождения.

Апробация работы: Материалы диссертации докладывались на: II Межд. науч.-практ. конф. «Почва как связующее звено ...», 2006 г., г. Иркутск; Всерос. науч.-практ. конф. с межд. участием «Социально-экологические проблемы ...», 2006 г., г. Красноярск; XIV всерос. студ. науч.-практ. конф. с межд. участием. «Безопасность-09», Иркутск, 2009 г.; Межвуз. конф. студ. и аспирантов «Полезные лекарственные растения ...», г. Иркутск, 2010 г. и Межд. науч. конф. «Проблемы экологии», г. Иркутск, 2010 г. Результаты исследований использованы при чтении курсов лекций «Прикладная экология»; «Рациональное природопользование» на биолого-почвенном факультете ФГБОУ ВПО «ИГУ». Результаты исследований использованы в отчетах о НИР по проектам РФФИ: № 05-04-97237-Байкал-р; № 06-04-39003-ГФЕН_a (РФ – КНР); ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»: ГК № 02.740.11.0018 от 15.06.2009 г.; ГК № 02.740.11.0335 от 07.07.2009 г.; ГК № 02.740.11.0418 от 30.09.2009 г.; ФЦП «Исследование и разработка по приоритетным направлениям ... на 2007-2013 годы»: ГК № 11.519.11.5016 (РФ – КНР) от 28.10.11 г. Материалы работы включены российско-китайской Комиссией по подготовке встреч глав правительств в Программу научно-технического сотрудничества № 12-35 от 24.09.2008 г.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 24 работы, в том числе из них в журналах рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ – 5 и получено 6 патентов на изобретение.

Объем и структура диссертации: Диссертация изложена на 147 страницах и состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 61 рисунком и содержит 12 таблиц. Список литературы включает 188 работ (101 отечественная и 87 зарубежных источника).

Личный вклад автора: Лабораторные исследования, анализ полученных данных, обобщение и интерпретация результатов, подготовка материалов для

докладов и публикаций проведены лично или при определяющем вкладе автора. Работа проводилась в период 2003 – 2012 гг. на биолого-почвенном факультете и НИИ биологии ИГУ, в НИ «Иркутском государственном техническом университете», в Байкальском музее ИНЦ СО РАН.

ГЛАВА 1. Литературный обзор

Приводится анализ литературных данных о взаимовлиянии почвенных олигохет и микроорганизмов, иммунной системе ДЧ, о методах оценки антимикробных свойств ДЧ и активности фармацевтических препаратов, получаемых на их основе, о методах биотестирования.

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

Объекты исследования. В качестве объектов исследования брали:

- беспозвоночных животных: червей *Eisenia fetida*, байкальских (*Mesenchytraeus bungei*) и речных (*Tubifex tubifex*) олигохет, планарий (*Phagocata sibirica*), ракообразных (*Daphnia magna*, *Moina* sp. и *Simacephalus vetulus*), простейших (*Euglena* sp., *Paramecium caudatum*);

- растения: одноклеточные зеленые водоросли (*S. quadricauda*, *D. salina*), сине-зеленые нитчатые водоросли (*Oscillatoria* sp.); многоклеточные харовые водоросли (*Nitella* sp.); высшее водное растение (*Elodea canadensis*); кресс-салат “Данский” (“Агрос”, Россия);

- микроорганизмы: бактерии (*P. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp., *B. thuringiensis*, *Rhodococcus erythropolis*); микромицеты: *T. viride*; дрожжи: *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*.

Для микробиальной инокуляции использовали культуры *Staphylococcus* sp., *B. thuringiensis*, *R. erythropolis*, *Streptomyces* sp., *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *T. viride*, *S. quadricauda*, *D. salina* и препарат «Бифидумбактерин», содержащий штамм *Bifidobacterium bifidum*.

Методы исследования

Микробиологические методы. Для определения количества гетеротрофных микроорганизмов в кишечном тракте ДЧ проводили асептическое вскрытие олигохет, извлекали кишечную трубку, полученный материал гомогенизировали, затем объем гомогената доводили до 5 мл, готовили ряд серийных разведений и осуществляли посев на рыбо-пептонный агар (РПА) и среду Эндо (Вятчина и др., 2005). Для изучения возможности сохранения микроорганизмов различных групп в кишечнике ДЧ проводили инокуляцию, используя пероральное инъекционное и метод свободного скармливания. Для селективного выделения *Staphylococcus* sp. использовали РПА с 6,5 % NaCl; *B. thuringiensis* – РПА; *R. erythropolis*, и *Y. lipolytica* – среду следующего состава (%): KNO_3 – 0,40; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,08; KH_2PO_4 – 0,06;

Na₂HPO₄ – 0,14; гексадекан – 1; агар – 2; рН 7,2 – 7,3. Для изоляции *Streptomyces sp.* использовали среду Гаузе, *T. viride* – среду Чапека (Практикум по микробиологии..., 2005), *S. cerevisiae* – среду IEPD следующего состава (г/л): глюкоза – 20, пептон основной – 10, автолизат дрожжевой – 5, агар – 23. Количественный учет микроорганизмов осуществляли после посева соответствующих разведений гомогената на селективные среды, подсчитывая количество колониеобразующих единиц (КОЕ/мл). Для оценки антимикробных свойств ДЧ и препаратов на их основе использовали диско-диффузионный метод (Практикум по микробиологии..., 2005).

Приготовление препаратов из ДЧ. Препараты из ДЧ изготавливали по традиционной китайской методике (Сунь, 2004). Для повышения эффективности ВП ДЧ предварительно контаминировали суспензией *Staphylococcus sp.*, помещали в емкость с водой, нагретой до температуры 40 °С на 5 мин, или выдерживали при температуре + 5 °С на 30 мин (Стом, 2008). Для приготовления ВП с пониженной активностью исходные ВП прогревали при 90 °С в течение 30 мин. Для обогащения ВП микроэлементами ДЧ предварительно 2 сут выдерживали в водных растворах солей (ZnSO₄, K₂Cr₂O₇, CuSO₄) либо до 10 сут в почвенных субстратах, пропитанных этими растворами.

Методы биотестирования. Биологическую активность ВП оценивали по их влиянию: на скорость пенообразования в суспензии дрожжей с глюкозой (Вятчина и др., 2009); изменение частоты сердцебиения дафний (Колупаев, 1989) и выживаемость кладоцер (ФР 1.39.2001.00283); гибель инфузорий (Голубкова, 1983; Р 52.24-94; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98); прорастание семян кресс-салата (Лященко, 1999); циклоз в клетках нителлы и листьях элодеи (Stom *et al*, 1974; Дмитриева, 1988); на фототаксис планарий и *M. bungei* (Ключевская, 2006); поведенческие реакции олигохет *M. bungei* и *T. tubifex* (Стом и др., 2008). Влияние *T. viride* на физиологическое состояние ДЧ фиксировали по изменению скорости их зарывания в землю (Черных и др., 1993).

Биохимические методы. Определение целлюлазной активности кишечного сока ДЧ проводили по Mandels (1974), анализ белка – по Лоури (Бузун и др., 1982). Кишечный сок получали в асептических условиях путем гомогенизирования и последующего центрифугирования кишечников ДЧ (Стом и др., 2010).

Рентгенфлуоресцентный анализ. Содержание микроэлементов в ДЧ анализировали в Институте геохимии СО РАН с использованием рентгенофлуоресцентного спектрометра «S4 Pioneer» под руководством в.н.с., д.х.н. Т.Н. Гуничевой.

Люминесцентные методы. Флюоресценцию хлорофилла клеток водорослей измеряли на «Флюорат 03-2 М» по ФР.1.39.2007.03223. Люминесценцию хлорофилла растений анализировали с помощью микроскопа «Axio Scope A1».

Другие методы. Целомическую жидкость получали в асептических условиях путем рассечения кожно-мышечного мешка без повреждения кишечной трубки. Проверку воздействия различных лекарственных средств на темпы регенерации ДЧ проводили путем подсчета сегментов животных, отросших в течение 2-х недель, после отсечения 5-и хвостовых сегментов с последующей трехдневной обработкой ран исследуемыми препаратами.

Статистическая обработка данных. Полученные результаты исследований статистически обработаны с использованием пакета программ *Microsoft Excel 2010*. Все эксперименты производили в 5 независимых опытах в 3 параллельных повторностях. Достоверность различия результатов определяли с помощью критерия Стьюдента. Выводы сделаны при $p \leq 0,05$ (Гланц, 1998).

ГЛАВА 3. Антимикробные свойства ДЧ и получаемых из них вермипрепаратов

В связи с тем, что для усиления антимикробных свойств целомической жидкости *E. fetida* проводили инокуляцию червей культурами микроорганизмов (*Staphylococcus* sp., *B. thuringiensis*, *R. erythropolis*, *Y. lipolytica*, *T. viride*), изучали их способность сохраняться в кишечнике *E. fetida*. В кишечнике ДЧ длительно (на протяжении 60 сут эксперимента) фиксировали наличие штаммов *Staphylococcus* sp., *B. thuringiensis*. Культуры *Streptomyces* sp. и *Y. lipolytica* сохранялись в кишечнике ДЧ в течение 8 сут. После инъекции *per os* водорослей клетки *S. quadricauda* сохранялись в кишечнике *E. fetida* до 8, а *D. salina* и *Oscillatoria* sp. – до 6 сут. Штамм *T. viride* высевался из кишечника ДЧ в течение 40 сут. Таким образом, в микрофлоре кишечника ДЧ могут сохраняться и размножаться, инокулированные микроорганизмы. При этом они меняют трансформационный потенциал ДЧ. Так, свободное скармливание триходермы увеличивало целлюлазную активность в кишечнике олигохет в 14 раз. Другим подтверждением участия аутомикрофлоры кишечника ДЧ в трансформации целлюлозы служит снижение целлюлазной активности и способности ДЧ переваривать целлюлозосодержащие субстраты по сравнению с контролем при инокуляции олигохет антибиотиками «Амоксициллином» и «Флуконазолом». При проведении экспериментов отмечали угнетающее действие *T. viride* на жизнеспособность и подвижность ДЧ. Эффект действия зависел от титра инокулируемой суспензии и возраста культуры. При пероральной инокуляции червей суспензий 2-х недельной культуры с титрами

порядка $10^4 - 10^5$ КОЕ/см³ (объем вводимой суспензии 0,05 см³) черви погибали в течение 2-3 сут.

При использовании диско-диффузионного метода повышенный бактериостатический эффект целомической жидкости червей выявлен по отношению к *Staphylococcus* sp. и *P. aeruginosa*. Зона угнетения роста этих тест-культур достигала $46,0 \pm 6,8$ и $50,0 \pm 7,4$ мм, соответственно. Менее выраженное влияние целомической жидкости зафиксировано при использовании в качестве тест-культур *B. thuringiensis* и *Y. lipolytica*. Диаметр зон угнетения роста составлял $12,0 \pm 1,8$ и $7,0 \pm 1,0$ мм, соответственно. Инокуляция ДЧ суспензиями культур *B. thuringiensis* и *Staphylococcus* sp. приводила к усилению бактериостатических свойств целомической жидкости ДЧ. При использовании *B. thuringiensis* повышение антибактериальных свойств целомической жидкости происходило через полчаса после инокуляции. Зона угнетения роста *B. thuringiensis* составляла $40,5 \pm 3,0$, в то время как в контроле – $10,0 \pm 1,4$ мм (рис. 1).

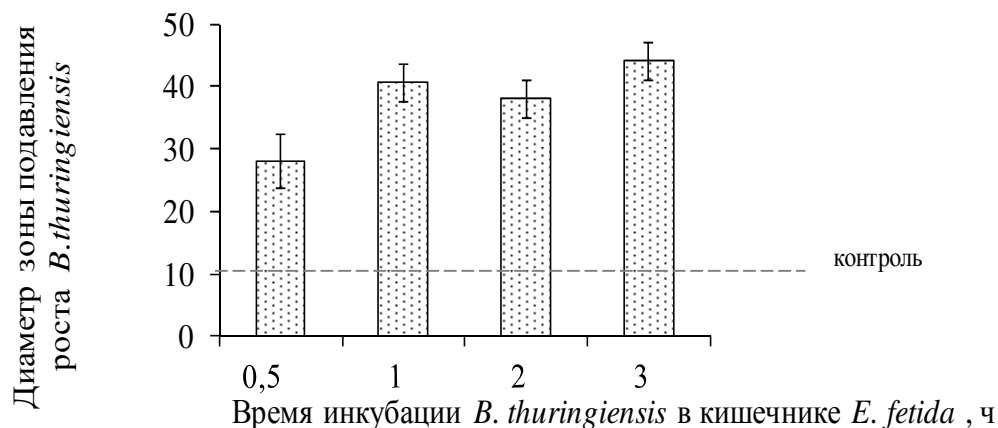


Рисунок 1. Влияние инокуляции дождевых червей суспензией *Bacillus thuringiensis* на способность целомической жидкости *Eisenia fetida* подавлять рост тест-культуры

После инокуляции ДЧ суспензией *Staphylococcus* sp. повышение бактериостатического эффекта целомической жидкости отмечали через 30 мин. Зона угнетения роста *Staphylococcus* sp. составляла $38,0 \pm 4,0$, в то время как в контроле – $25,0 \pm 1,5$ мм ($t_d=3,02$; $p \leq 0,05$). Максимальную активность целомической жидкости фиксировали через 4 ч после инокуляции. В этом случае зона подавления роста *Staphylococcus* sp. достигала $71,0 \pm 4,0$ мм. Появление более обширных, чем в контроле (целомическая жидкость неинокулированных червей), зон подавления роста на газоне *Y. lipolytica* наблюдали вокруг бумажного диска, пропитанного целомической жидкостью червей, инокулированных *T. viride*.

Проводили сравнительное изучение антимикробных свойств 1 %-ых интактных ВП из ДЧ, а также препаратов, приготовленных из червей, подвергнутых биологической (контаминация *Staphylococcus* sp.) и физической (выдерживание при температуре $+40$ °С в течение 5 мин и $+5$ °С в течение получаса) активации.

Согласно данным, полученным с помощью диско-диффузионного метода, повышенной чувствительностью к действию интактных препаратов обладали штаммы *B. thuringiensis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp. Зона подавления роста этих культур составляла $30\pm4,6$; $22\pm3,2$ и $20\pm2,4$ мм, соответственно. Штаммы *Y. lipolytica* и *R. erythropolis* проявляли большую устойчивость к интактным ВП (рис. 2).

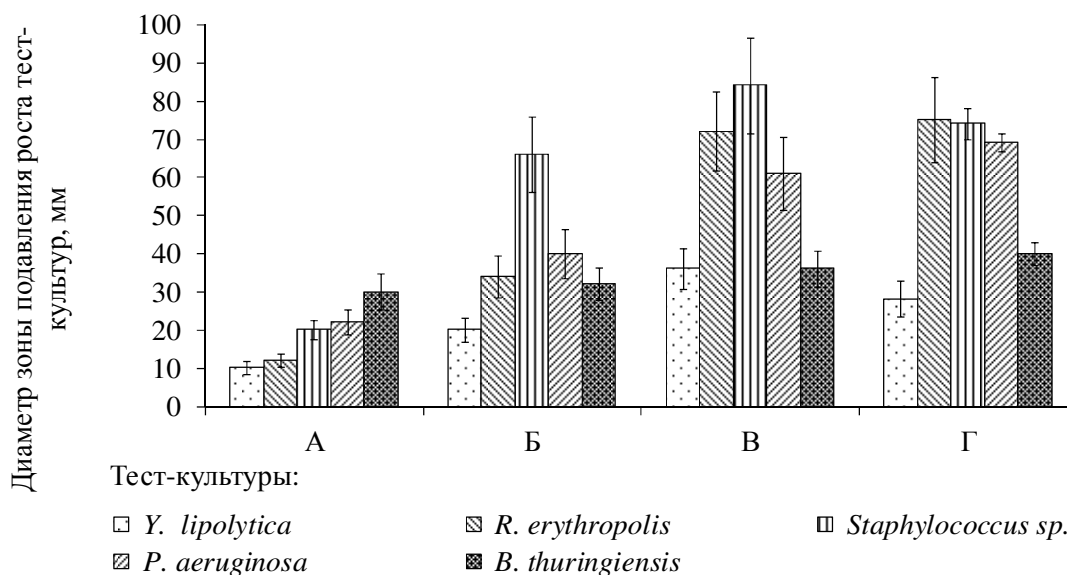


Рисунок 2. Сравнительная оценка влияния интактных и активированных ВП на рост микроорганизмов: А – интактные ВП; Б – ВП, полученные из червей, активированных при + 40°C; В – ВП, полученные из червей, активированных при + 5°C, Г – ВП, полученные из червей, подвергнутых контаминированию *Staphylococcus* sp.

ВП, полученные из червей, подвергнутых предварительной биологической и физической активации, проявляли более высокую бактериостатическую активность по сравнению с интактными. Так, вокруг дисков, пропитанных суспензиями интактных 1 %-ых ВП зона подавления роста культуры *Staphylococcus* sp. составляла $20,0\pm2,4$ мм, а вокруг дисков с препаратами, полученными из червей, подвергнутых предварительному нагреванию, охлаждению и контаминации *Staphylococcus* sp., – $66,0\pm9,8$; $84,0\pm12,6$ и $74,0\pm11,6$ мм, соответственно. Сходная закономерность в действии испытуемых препаратов прослеживалась и при использовании в качестве тест-культур *P. aeruginosa*, *R. erythropolis* и *Y. lipolytica*. Следует отметить, что существенных различий между биологической активностью ВП с усиленными свойствами и интактных ВП по отношению к *B. thuringiensis* не наблюдали. Предлагаемые нами способы повышения активности ВП, как с помощью биологической, так и физической активации червей, находят свое научное обоснование в полученных нами материалах, а также в работах Лассалья с соавторами и Суня (Lassalle *et al*, 1988; Sun, 1995; 1997; Стом и др., 2006).

После посева спор *T. viride* на среду Чапека и обработки засеянного субстрата водными суспензиями 1 %-ых ВП, интактных и ослабленных нагреванием, выявили следующее. Интактные ВП подавляли прорастание спор *T. viride* практически полностью. После выдерживания при 90 °С в течение 30 мин ВП теряли способность препятствовать прорастанию спор триходермы.

Были проведены исследования по проверке возможности использования реакции пенообразования в суспензии дрожжей с глюкозой для оценки биологической активности ВП. Интактные ВП из *E. fetida* в концентрации 1 % ингибировали пенообразование на 80 ± 12 % по сравнению с контролем ($t_d=8$; $p \leq 0,05$). ВП, выдержанные при температуре 90 °С в течение получаса, в меньшей степени, чем интактные препараты ингибировали пенообразование (на 40 ± 8 %; $t_d=2,9$; $p < 0,05$). Таким образом, получасовое прогревание вермипрепаратов при температуре 90 °С не приводило к полной потере ими микробоцидных свойств. Довольно высокая устойчивость ВП к нагреванию находит объяснение в относительной термостойкости веществ ДЧ, отвечающих за антибактериальное действие (Sun, 1995; 1997).

Предложенная тест-реакция, основанная на пенообразовании в суспензии дрожжей, оказалась пригодной для оценки активности и других многокомпонентных лекарственных средств (настойка и отвар корня левзеи сафлоровидной, настойка элеутерококка, отвары: шалфея лекарственного, эдельвейса скученного, кошачьей лапки двудомной, препарат мумиё «Золотое мумиё», а также стимулятора роста «Терпенсил») (Стом и др., 2010).

В плане ингибирования роста препаратами из *M. bungei* и *P. sibirica* повышенную чувствительность проявляли штаммы *Y. lipolytica*, *Staphylococcus* sp. и *B. thuringiensis*.

Подавляющее большинство препаратов коммерческих многокомпонентных ВП, так же как и поливитаминов, получают механическим смешиванием, добавляя к ним различные биологически активные компоненты, в частности микроэлементы (Багирова и др., 1998; Кашина и др., 1998; Сунь, 2004). Отдельные ингредиенты таких смесей токсичны сами по себе, например, многие металлы-микроэлементы. Поэтому необходимо вести поиск путей экранирования токсичности потенциально опасных биологически активных веществ при их использовании в лечебных целях. Одним из таких приемов может явиться их предварительная ассимиляция живыми организмами. С этой целью изучали накопление ионов металлов в ДЧ. В контрольных червях содержание катионов цинка составляло 118 ± 15 мг/кг сухого вещества. При экспонировании червей в течение 20 ч в растворах с концентрацией ионов Zn^{2+} равной $0,36$ г/дм³ оно увеличивалось до 3295 ± 430 мг/кг. Выдерживание олигохет в модельных образцах почвы с концентрациями Cr^{6+} – 100 и Cu^{2+} – 400

мг/кг при том же времени инкубирования приводило к нарастанию концентраций этих металлов в червях от следовых значений до 37 ± 6 и 90 ± 10 мг/кг, соответственно.

Таким образом, некоторые микроорганизмы сохраняются в кишечнике, инокулируемых ими ДЧ, достаточно длительное время. Инокуляция ДЧ суспензиями культур микроорганизмов приводит к усилению антимикробных свойств их целомической жидкости. ВП, полученные из червей, подвергнутых предварительной биологической и физической активации, проявляют более высокую бактериостатическую активность по сравнению с интактными препаратами. После выдерживания при 90°C в течение 30 мин активность ВП понижается, но не полностью. Тест-реакция, основанная на пенообразовании в суспензии дрожжей, пригодна и для оценки активности многокомпонентных лекарственных средств животного и растительного происхождения. Помимо *E. fetida* антимикробные препараты можно получать из других червей (*M. bungei* и *P. sibirica*).

ГЛАВА 4. Снижение бактериальной обсемененности вермисырья

Одной из проблем применения ДЧ в фармацевтике, косметологии, пищевой промышленности является высокая обсемененность их кишечника и покровов бактериальной микрофлорой, в составе которой возможно присутствие патогенных и условно-патогенных для человека микроорганизмов.

После часового экспонирования ДЧ, инокулированных 1,5%-ыми растворами перекиси водорода, наблюдали почти пятикратное снижение количества бактерий в переднем и среднем отделах кишечника (рис. 3) и уменьшение класса разнообразия гетеротрофных бактерий (с 20 до 6 морфотипов) уже через 30 мин по сравнению с контролем без угнетения подвижности ДЧ.

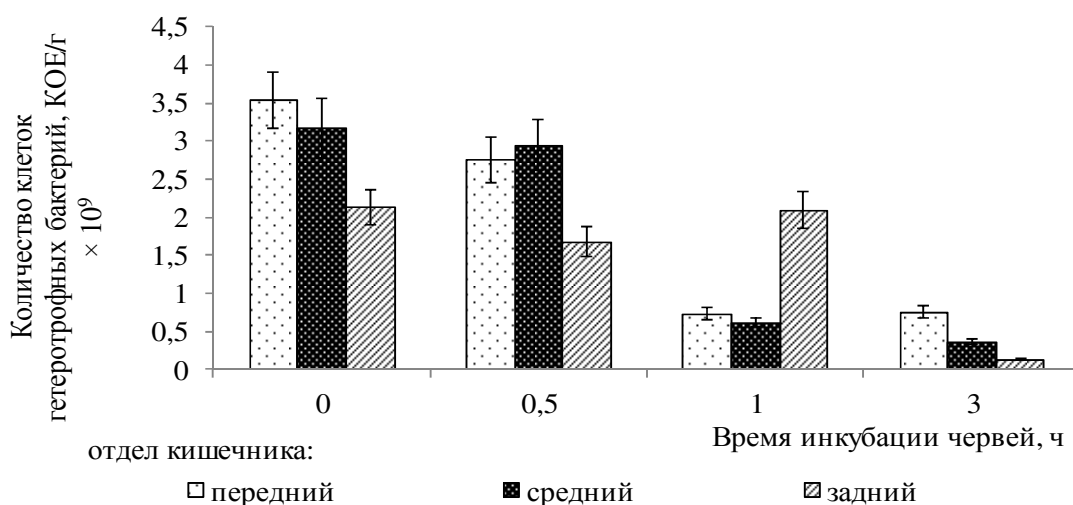


Рисунок 3. Влияние разного времени экспозиции на количество гетеротрофных бактерий в кишечниках *Eisenia fetida*, инокулированных 1,5-% перекисью водорода

При применении отваров лекарственных трав, чаги (1 : 20), суспензий эфирных масел для снижения обсемененности кишечного тракта *E. fetida* высокий микробоцидный эффект фиксировали в вариантах с чаем «Ермак», чагой, лавандовым и можжевельным маслами. При проведении микробиологического анализа в кишечнике *E. fetida* наряду с другими микроорганизмами нами были обнаружены бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Имеются данные о применении препарата «Бифидумбактерин» для коррекции дисбиоза кишечной микробиоты червя (Верховцева и др., 2004). В связи с этим мы предприняли попытку снизить количество гетеротрофных бактерий, в том числе БГКП, «пролечив» червей препаратом «Бифидумбактерин». Количество гетеротрофных бактерий на 10-е сутки эксперимента в переднем отделе кишечника снизилось с $(3,54 \pm 0,34) \times 10^9$ до $(1,79 \pm 0,15) \times 10^4$, в среднем – с $(3,17 \pm 0,28) \times 10^9$ до $1,28 \pm 0,14 \times 10^6$ КОЕ/г. В заднем отделе кишечника червя исследуемые бактерии при посеве не были обнаружены. Дальнейшая инкубация червей (до 30 сут) не приводила к значительному изменению количества гетеротрофных бактерий в их кишечнике. Применение препарата «Бифидумбактерин» способствовало существенному снижению количества БГКП в кишечнике *E. fetida*. После 10-суточной инкубации червей численность БГКП в переднем отделе кишечника снизилась с $(1,44 \pm 0,25) \times 10^9$ до $(1,71 \pm 0,15) \times 10^4$, в среднем – с $(1,20 \pm 0,08) \times 10^9$ до $(1,02 \pm 0,09) \times 10^5$ КОЕ/г. В заднем отделе кишечника червя исследуемые бактерии при посеве не были обнаружены. На 20-е и 30-е сут эксперимента существенного изменения количества БГКП не отмечали.

Инкубирование червей на целлюлозном субстрате, в который ежедневно добавляли суспензию пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, приводило к снижению численности гетеротрофных бактерий в кишечнике, в том числе БГКП, но в меньшей степени, чем при использовании «Бифидумбактерина».

Таким образом, инокулирование ДЧ растворами перекиси водорода, отварами лекарственных трав, чаги и эмульсиями эфирных масел, скармливание препарата «Бифидумбактерин» и дрожжей *S. cerevisiae* целесообразно использовать для снижения обсемененности вермисырья.

ГЛАВА 5. Влияние дождевых червей и вермипрепаратов на растения

С помощью диско-диффузионного метода исследовали действие целомической жидкости и 1 %-ых суспензий интактных, а также ослабленных нагреванием ВП, на рост одноклеточных водорослей. ВП стимулировали рост *D. salina* больше, чем целомическая жидкость. ВП и целомическая жидкость усиливали рост *S. quadricauda*, но подавляли ростовые процессы *Oscillatoria* sp. При добавлении в суспензию клеток *S. quadricauda* интактных ВП в диапазоне концентраций 0,01 –

0,25 % наблюдали увеличение флюоресценции суспензий водорослей. При этом максимальное повышение уровня флюоресценции (на 50 %) по сравнению с контролем фиксировали при концентрации ВП 0,1 %.

В клетках *Nitella* sp., инкубированных в 1 %-ых суспензиях ВП, красное свечение сменялось на оранжево-розовое через 20 ± 2 ч, розовое через 30 ± 2 ч, и на розово-серое – через двое суток. При действии ВП, ослабленных тепловой обработкой, розово-красное свечение близкое к свечению в контроле сохранялось более 2 сут. ВП (1%) останавливали циклоз в клетках у основания листа *E. canadensis* через $3,5 \pm 0,3$ часа. Ослабленные нагреванием 1% ВП даже при экспонировании более суток не подавляли циклоз в клетках листочков *E. canadensis*. При инкубировании нителлы в суспензиях ВП в диапазоне концентраций от 0,6 до 0,8 % фиксировали снижение скорости циклоза в её клетках. При увеличении же концентрации ВП от 1 % и выше наблюдали полное прекращение движения цитоплазмы. Интактные 1 %-ые ВП подавляли циклоз в клетках *Nitella* sp. через $2 \pm 0,1$ ч, тогда как 1 %-ые ВП, ослабленные нагреванием, только через $4 \pm 0,1$ ч (рис. 4).

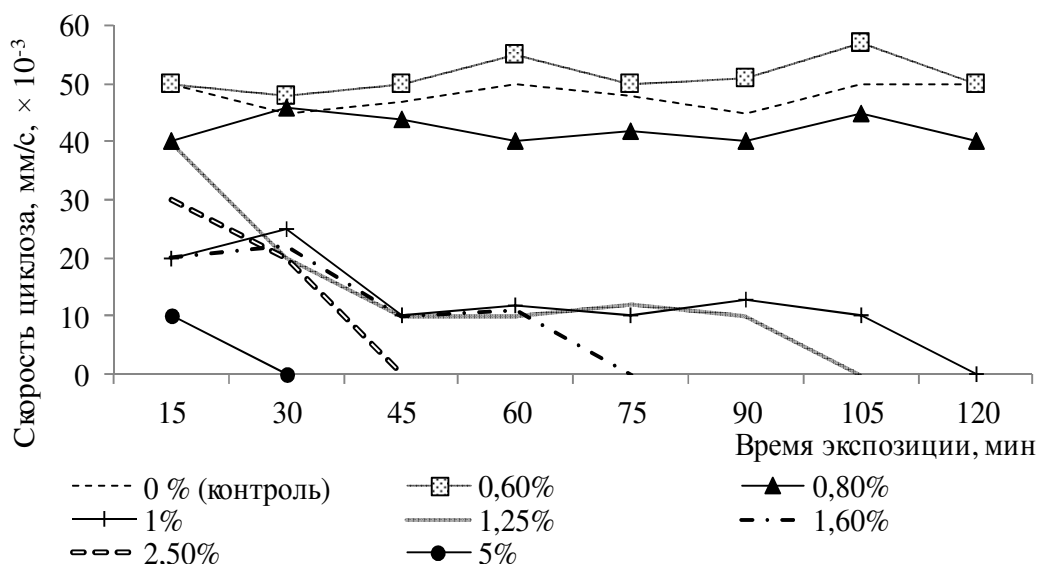


Рисунок 4. Влияние различных концентраций интактных вермипрепаратов на скорость движения цитоплазмы циклоза в клетках *Nitella* sp.

ВП (1 %) оказывали влияние не только на водоросли, но и на высшие растения. При выдерживании семян кресс-салата в 1 %-ых суспензиях интактных ВП проросло только 30 ± 4 % семян по отношению к контролю, а при обработке ВП, ослабленными выдерживанием при 90 °C в течение 30 мин, всхожесть семян составляла 60 ± 8 % ($t_d=4,2$, $p \leq 0,05$).

Таким образом, ВП и целомическая жидкость стимулируют рост зеленых (*S. quadricauda*, *D. salina*), но ингибируют ростовые процессы сине-зеленой (*Oscillatoria* sp) водорослей. ВП подавляют циклоз в клетках водных макрофитов

(*Nitella* sp., *E. canadensis*), а уже затем изменяют интенсивность люминесценции их хлоропластов. Ослабленные нагреванием ВП слабее подавляли движение цитоплазмы и люминесценцию хлоропластов гидрофитов, чем интактные. Циклоз и люминесценция – более чувствительны к действию испытанных препаратов у клеток элодеи по сравнению с клетками нителлы. Прорастание семян кресс-салата больше подавляют интактные ВП, чем ВП, ослабленные нагреванием. Полученные результаты при дальнейшей доработке могут быть использованы для оценки биологической активности лекарственных средств помощью описанных тест-реакций растений.

ГЛАВА 6. Влияние вермипрепаратов и других лекарственных средств на червей

Суспензии с 6 %-ым содержанием ВП вызывали гибель планарий *P. sibirica* через $1,5 \pm 0,2$ ч. При 1%-ой концентрации ВП планарии выживали, но ослаблялась их реакция на свет. Так после часового инкубирования в затемненный сектор перемещалось только $39,3 \pm 4,0$ % особей, а в контроле – 80 ± 10 % ($t_d=3,8$; $p \leq 0,05$). Более низкие концентрации ВП (0,5; 0,1; 0,01%) не оказывали существенного влияния на реакцию фототаксиса плоских червей. Предложенная тест-реакция, основанная на фототаксисе планарий оказалась пригодной также для оценки активности и других лекарственных средств (настойки левзеи, элеутерококка, стимулятора роста «Терпенсил») (Быбин и др., 2012).

В контроле, при помещении олигохет *M. bungei* и *T. tubifex* в чистую воду, наблюдали их сползание в течение 10 ± 3 мин, взаимное переплетение с образованием характерного клубочка. Сходную картину отмечали и при действии ВП, ослабленных нагреванием, но в этом случае для сползания в клубок требовалось больше времени – 30 ± 4 мин. В присутствии 1%-ых препаратов, полученных из *E. fetida* и *M. bungei*, происходило обездвиживание олигохет *M. bungei* через $7,5 \pm 1,2$ мин. При этом олигохеты не сползались в клубок, их тела перед обездвиживанием волнообразно сокращались. В варианте с 0,5%-ыми ВП подвижность олигохет снижалась уже через 10 мин экспозиции, сборка в клубок также отсутствовала. ВП в концентрации 0,25 % вызывали скручивание червей в спирали, сползание в плохо оформленный клубок. При контакте с 0,15 %-ыми ВП все особи покидали суспензию и забирались на верхнюю створку чашки Петри. В 0,01 %-ой суспензии наблюдали очень слабую реакцию на ВП, проявляемую в треморе тела животных. В течение получаса тремор прекращался. При этом черви, так же как и в контроле, собирались в клубок. Эта же концентрация ВП на 80 ± 10 % снижала скорость ухода *M. bungei* в затемненную зону, что позволяет говорить о большей чувствительности реакции фототаксиса по сравнению с поведенческими реакциями олигохет, описанными выше.

ВП, интактные и ослабленные нагреванием, в концентрации 0,01% при обработке места ранения ускоряли регенерацию хвостовых сегментов тела ДЧ в среднем в 2,6 раз ($t_d=9$; $p\leq 0,05$) по сравнению с контролем. Повышение концентрации интактных ВП до 0,1% приводило к подавлению регенерации в среднем на 56 % ($t_d=3,1$; $p\leq 0,05$). В то же время к ослабленным нагреванием ВП в этой же концентрации животные были нечувствительны. Дальнейшее повышение содержания обоих типов ВП до 0,5 и 1% значимо не изменяло темпы регенерации сегментов. Реакции регенерации ДЧ оказались пригодными и для оценки активности других многокомпонентных лекарственных средств. Препарат «Золотое мумие» в концентрации 0,1 и 1% ингибировал регенерацию хвостовых сегментов у ДЧ в среднем на 32 и 50 % ($t_d=2,6$; $t_d=4,2$; $p\leq 0,05$), соответственно, и стимулировал при содержании мумиё 0,01 % на 112 % ($t_d=6,2$; $p\leq 0,05$) по сравнению с контролем. Отвары (1 : 20) боровой матки 1-го года хранения сырья подавляли скорость регенерации хвостовых сегментов ДЧ в среднем на 52 % ($t_d=7,7$; $p\leq 0,05$) по сравнению с отварами из боровой матки 10-летней давности.

Таким образом, определенные концентрации ВП снижают реакции планарий *P. sibirica* на свет. Интактные ВП, в отличие от ВП, ослабленных нагреванием, вызывают обездвиживание олигохет *M. bungei* и *T. tubifex*, а также препятствуют их сползанию в клубок. ВП и мумие в низких концентрациях стимулируют, а в более высоких ингибируют регенерацию хвостовых сегментов ДЧ. Эти реакции являются перспективными биопробами, так как позволяют подбирать эффективные дозы ВП и других лекарственных средств, необходимых для интенсификации регенерации тканей.

ГЛАВА 7. Влияние вермипрепаратов и других лекарственных средств на некоторые водные тест-объекты

Препараты из *E. fetida*, *M. bungei* и *P. sibirica* в концентрации 6 % эффективно понижали частоту сердцебиения рачков *D. magna* и приводили к их гибели в интервале 45 – 60 мин. Интактные ВП из *E. fetida* подавляли сердцебиение дафний сильнее, чем ослабленные нагреванием. Так 1%-ые ВП останавливали работу сердца дафнии через 60 ± 15 мин, а ослабленные нагреванием ВП – только через 180 ± 30 мин ($t_d=3,6$; $p\leq 0,05$).

Отвары (1 : 20) из более старых сборов боровой матки (10 лет хранения сырья) подавляли сердцебиение дафнии интенсивнее, чем свежие (1 год хранения). В первом случае сердце рачков прекращало свою работу через 120 ± 15 мин, во втором – 210 ± 15 мин. Растворы с 0,01 %-ым содержанием мумие препарата «Золотое мумие» подавляли сердечную деятельность дафнии через 75 ± 10 мин, а 0,1 %-ым – через 45 ± 10 . Сильно снижали частоту сердцебиения дафний и отвары других

бактерицидных лекарственных растений, в частности ромашки аптечной, курльского чая (Быбин и др., 2010).

При инкубировании дафниид: *Moina sp.* и *S. vetulus* – в 1 %-ой суспензии ВП (*E. fetida*) гибель рачков фиксировали в близких пределах – 30–35 мин, а в случае с ослабленными нагреванием ВП – через 198–210 мин.

Через 15 мин в ВП в концентрации 1 % вызывали обездвиживание клеток *Euglena sp.*, а через 40±6 мин – трансформацию формы клеток эвглени из веретеновидной в шарообразную. Добавление 0,5 % ВП приводило к потере подвижности *P. caudatum* через 15 ± 2 мин.

Резюмируя данный раздел работы, следует обратить особое внимание на то, что ВП, в том числе полученные из других олигохет (*M. bungei*) и плоских червей (*P. sibirica*), проявляют не только бактерицидную активность, но и оказывают выраженное действие на беспозвоночных животных. Препараты из *E. fetida*, *M. bungei*, *P. sibirica* понижают частоту сердцебиения рачков *D. magna* и приводят к их гибели. Интактные ВП из *E. fetida*, более старые сборы боровой матки подавляют сердцебиение дафний сильнее, чем ослабленные нагреванием ВП и отвары свежей боровой матки. Интактные ВП приводят к гибели копепод *Moina sp.* и *S. vetulus* быстрее, чем ослабленные нагреванием ВП. Интактные и ослабленные нагреванием ВП вызывают обездвижение клеток *Euglena sp.* и *P. caudatum*.

На основании полученных результатов предложены следующие практические рекомендации:

1. Использовать выдерживание ДЧ при +5 °С в течение 30 мин для повышения бактерицидной активности получаемых из них ВП (патент РФ № 2322993).
2. Для снижения обсемененности кишечника ДЧ гетеротрофными бактериями при получении ВП применять 1,5 % перекись водорода или соответствующие разведения эфирных масел, отвары лекарственных трав, а также скармливание «Бифидобактерина» и сахаромикетов (патент РФ № 2336084).
3. Для оценки биологической активности ВП, а также других многокомпонентных лекарственных средств растительного и животного происхождения, фармацевтических препаратов использовать методы биотестирования, основанные на поведенческих реакциях олигохет (патент РФ № 2377561 “Способ биотестирования активности препаратов, полученных из дождевых червей”) и изменении сердечной деятельности дафний (патент РФ № 2413219 “Способ оценки активности вермипрепаратов”).

ВЫВОДЫ

1. При исследовании взаимовлияния ДЧ и микроорганизмов показано, что представители ряда групп микроорганизмов при инокуляции ДЧ способны

сохраняться в кишечном тракте олигохет: актиномицеты *Streptomyces* sp. и дрожжи *Y. lipolytica* в течение 8-и сут, бактерии: *Staphylococcus* sp. и *B. thuringiensis* – до 60 сут; одноклеточные зеленые водоросли: *S. quadricauda*, *D. salina*, цианобактерии *Oscillatoria* sp. – до 6-и сут, а целлюлозоразрушающий микромицет (*T. viride*) более 40 дней.

2. Добавление антибиотиков («Флуконазол», «Амоксициллин») снижало, а пероральная инъекция *T. viride* интенсифицировала способность ДЧ переваривать целлюлозу. Свободное скармливание триходермы увеличивало целлюлазную активность кишечника олигохет в 14 раз.

3. По чувствительности к угнетающему действию целомической жидкости ДЧ изученные штаммы микроорганизмов располагаются в следующий ряд: *Oscillatoria* sp. > *P. aeruginosa* > *Staphylococcus* sp. > *B. thuringiensis* > *Y. lipolytica* > *R. erythropolis*. Инокуляция *per os* ДЧ культурами *Staphylococcus* sp. и *B. thuringiensis* усиливала антимикробные свойства целомической жидкости ДЧ в 3 и 4 раза, соответственно.

4. При инокуляции *per os* и свободном скармливании ДЧ препарата «Бифидумбактерина», сахаромицетов, а также при действии перекиси водорода (1,5%), препаратов эфирных масел, отваров лекарственных трав в кишечнике олигохет существенно снижалось количество гетеротрофных бактерий, в том числе БГКП.

5. При контаминации *Staphylococcus* sp. или выдерживании ДЧ при 40 °С в течение 5 мин антимикробные свойства ВП, полученных на их основе, усиливались в 3 раза, а после 30-минутной экспозиции при 5 °С – в 4 раза.

6. По чувствительности к ингибирующему действию ВП испытанные тест-реакции могут быть ранжированы следующим образом: сборка олигохет в клубок > частота сердцебиения дафний > рост *Oscillatoria* sp. > циклоз в клетках *Nitella* sp. и *E. canadensis* > изменение характера люминесценции хлорофилла в клетках *Nitella* sp. и *E. canadensis* > прорастание семян кресс-салата и спор грибов *T. viride* > регенерация хвостовых сегментов олигохет > пенообразование в суспензии хлебопекарных дрожжей > потеря подвижности клеток *Euglena* sp и *P. caudatum*. Получасовое выдерживание ВП при 90° С ослабляло их способность подавлять вышеназванные тест-реакции.

Список работ, в которых опубликованы основные положения диссертации:

Статьи в изданиях, включенных в список ВАК РФ:

1. Возможность сохранения жизнеспособности микроорганизмов после прохождения через кишечный тракт дождевых червей/О.Ф. Вятчина, О.С. Рыкова,

Д.И. Стом, **В.А. Быбин**//Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2005. – № 6. – С.131 – 133.

2. О возможности усиления иммунных свойств дождевых червей/ Д.И. Стом, **В.А. Быбин**, О.Ф. Вятчина//Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2006. – № 6. – 163 – 166.

3. Об интродукции некоторых штаммов микроорганизмов в кишечник красного калифорнийского гибрида (*Eisenia fetida Andrei bouche*)/О.Ф. Вятчина, Д.И. Стом, О.С. Рыкова, **В.А. Быбин** и др. // Вестник Бурятского гос. ун-та. Химия, биология, география. – Улан-Удэ, 2007. – Вып.3. – С.121 – 126.

4. Переваривание целлюлозы дождевыми червями под воздействием *Trichoderma viride*/Стом Д.И., **Быбин В.А.**, Приставка А.А. и др.// Известия Иркутской государственной экономической академии. – 2010. – № 5. – С. 290 – 293. – Электрон. Версия печат. Публик. – Систем. Требования: Adobe Acrobat Reader/ – URL: <http://http://www.eizvestia.isea.ru/reader/article.aspx?id=7148/> (дата обращения: 14.01.2012).

5. Утилизация целлюлозы зоомикробным комплексом/ Д.И. Стом, **В.А. Быбин**, А.А. Приставка и др.//В мире научных открытий. Красноярск: изд-во СФУ, 2010. – №4 (10), Ч. 10. – С. 67 – 69.

Патенты:

6. Способ биотестирования активности препаратов, полученных из дождевых червей/Д.И. Стом, А.Э. Балаян, С.В. Полехина, **В.А. Быбин**//Патент РФ № 2377561/ Бюл. № 36 от 27.12.2009.

7. Способ оценки активности вермипрепарата/**В.А. Быбин**, А.Э. Балаян, Д.И. Стом и др.//Патент РФ № 2413219/Бюл. № 6 от 27.02.2011.

8. Способ получения вермипрепаратов, обогащенных микроэлементами/Д.И. Стом, А.Э. Балаян, М.Н. Саксонов, **В.А. Быбин**//Патент РФ № 2414918/ Бюл. № 9 от 27.03.2011.

9. Способ снижения обсеменённости кишечника дождевого червя/А.В. Кононова, О.С. Рыкова, **В.А. Быбин** и др.//Патент РФ № 2336084/ Бюл. № 29 от 20.10.2008.

10. Стом Д. И. Способ оценки активности препаратов, полученных из дождевых червей/Д.И. Стом, **В.А. Быбин**, А.Э. Балаян//Патент РФ № 2415419/Бюл. 9 от 27.03.2011.

11. Стом Д.И. Способ получения фармацевтического препарата, обладающего антимикробным действием/Д.И. Стом; **В.А. Быбин**; О.Ф. Вятчина//Патент РФ № 2322993/Бюл. № 12 от 27.04.2008.

Прочие публикации:

12. **Быбин В.А.** Возможность сохранения жизнеспособности *Streptomyces* sp. после прохождения через кишечный тракт дождевых червей/ В.А. Быбин, О.Ф. Вятчина// Вестник Иркут. ун-та. – Иркутск: Иркут. ун-т, 2005. – С. 18 – 19.

13. Взаимодействие красного калифорнийского гибрида и целлюлозоразрушающего гриба *Trichoderma viridel* **В.А. Быбин**, А.А. Приставка, В.П. Саловарова, и др. //Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.М. Кожова: тез докл. Межд. науч. конф. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. – С. 388.

14. Влияние пассажа через кишечный тракт дождевых червей на выживаемость микроорганизмов/О.Ф. Вятчина, О.С. Рыкова, **В.А. Быбин** и др.//Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование. Иркутск, 2004. – С. 129 – 131.

15. Вятчина О.Ф. Способы снижения бактериальной обсемененности вермипрепаратов/О.Ф. Вятчина, А.С. Мунгалова, **В.А. Быбин** //Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.М.Кожова: тез докл. Межд. науч. конф. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. – С. 396.

16. Добрынин В.И. Люминесценция некоторых групп микроорганизмов/В.И. Добрынин, Е.В. Евсюнина, **В.А. Быбин** //Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.М.Кожова: тез докл. Междунар. науч. конф. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. – С. 405.

17. Оценка активности фармацевтических фитопрепаратов с использованием беспозвоночных животных и микроорганизмов/Д.И. Стом, Г.М. Федосеева, **В.А. Быбин** и др.//Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.М. Кожова: тез докл. Междунар. науч. конф.. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. – С. 467.

18. Повышение активности препаратов из дождевых червей / С.В. Полехина, **В.А. Быбин**, Д.И. Стом и др.//Вестник Иркут. ун-та. – Иркутск: Изд-во Иркут. Гос. ун-та, 2007. – С.19-21.

Материалы конференций:

19. Антимикробные свойства красного калифорнийского червя/**В.А. Быбин**, О.Ф. Вятчина, Д.И. Стом и др.//Мат. II Межд. науч.-практ. конф. «Почва как связующее звено ... », Иркутск, 2006. – С. 399 – 400.

20. **Быбин В.А.** Возможность сохранения жизнеспособности *Streptomyces* sp. после прохождения через кишечный тракт дождевых червей/В.А. Быбин//Материалы докладов XI Всерос. науч.-практ. конф. аспирантов и студентов с международным участием «Проблемы безопасности современного мира: Средства защиты и спасения «Безопасность – Об»». – Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 2006 – т. 1 – С. 56.

21. **Быбин В.А.** Возможность сохранения микроскопических водорослей после пассажа через кишечник дождевых червей *Eisenia fetida*/В.А. Быбин, Л.Ю. Тарасов, М.Н. Саксонов //Материалы докладов XIV всерос. студ. науч.-прак. конф. с международным участием. Современные проблемы безопасности жизнедеятельности, «Безопасность-09», – Иркутск: изд-во ИрГТУ, 2009. – с. 180 – 181.
22. **Быбин В.А.** Использование люминесценции хлорофилла и циклоза *Nitella sp.*, *Elodea canadensis* для биологического контроля активности препаратов, полученных из дождевых червей/В.А. Быбин, Д.И. Стом//Материалы докладов XIV всерос. студ. науч.-прак. конф. с международным участием. Современные проблемы ..., «Безопасность-09», Иркутск: изд-во ИрГТУ, 2009. – С. 182.
23. **Быбин В.А.** Оценка качества вермипрепаратов с использованием поведенческих реакций олигохет и рачков/В.А. Быбин, А.Э. Балаян//Материалы докладов XIV всерос. студ. науч.-прак. конф. с международным участием. Современные проблемы ..., «Безопасность-09». – Иркутск: изд-во ИрГТУ, 2009. – С. 181 – 182.
24. Получение новых фармацевтических препаратов на основе дождевых червей/**В.А. Быбин**, С.В. Полехина, Д.И. Стом и др.//Проблемы безопасности современного мира: способы защиты и спасения «Безопасность – 05»: Материалы докладов X Всерос. науч.-прак. конф. студентов и аспирантов.- Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 2007. – Т. 1. – С. 211 – 213.

Неоценимую помощь в проведении экспериментов и подготовке диссертации оказали к.б.н. Вятчина О.Ф., к.б.н. Саксонов М.Н., к.б.н. Балаян А.Н., проф. Саловарова В.П., к.б.н. Приставка А.А., проф. Федосеева Г.М., проф. Сунь Чжэньцзюнь, чл.-корр. РАН Ившина И.Б., к.б.н. И.А. Борзенков, проф. Чхенкели В.А.