



На правах рукописи

ЛУШНИКОВ АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ
И ГРИБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ
АНТИБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

Специальность:

03.01.06 – Биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

Научный руководитель:	Павловская Нинэль Ефимовна доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биотехнологии ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»
Официальные оппоненты:	Елена Михайловна Серба член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» Ольга Сергеевна Корнеева доктор биологических наук, профессор, проректор по научной и инновационной деятельности ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский Государственный аграрный университет имени императора Петра I» (ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ)

Защита диссертации состоится «15» декабря 2020 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д999.095.03 при РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд.443)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте РХТУ им. Д.И. Менделеева <https://diss.muctr.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ года

Учёный секретарь диссертационного совета Д999.095.03

кандидат технических наук, доцент



Ирина Васильевна Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Задачей современной биотехнологии является разработка, изучение и поиск новых природных биологически активных веществ, для использования их в агротехнологиях, в частности, для лечения инфекционных заболеваний животных и против возбудителей заболеваний растений. Среди вторичных метаболитов, выделенных из растений гречихи *Fagopyrum Mill*, овса *Avena sativa* и ячменя *Hordeum vulgare*, высокой биологической активностью отличаются Рутифлав, авенацин и гордецин (Павловская, 2014; Горькова, 2014; Гнеушева, 2014; Солохина, 2014; Костромичёва, 2014). В последние годы внимание исследователей привлекают грибы рода *Trichoderma*, как продуценты веществ, в том числе с противоопухолевой, противовирусной, антимикробной и иммуномодулирующей активностью (Druzhinina, 2016; Hermosa, 2016; Алимова, 2016). Наряду с этим они продуцируют соединения, подавляющие рост возбудителей грибных и бактериальных болезней растений. За последние годы большой прогресс был сделан в понимании биологической активности и определении структуры новой группы мембранно-активных метаболитов *Trichoderma* spp – пептаиболов, обладающих широким спектром действия и низкой токсичностью (Садыкова, 2016, 2017). Вопросы об использовании метаболитов *Trichoderma* spp. в качестве препаратов для борьбы с инфекционными заболеваниями животных и в биоконтроле возбудителей инфекции растений остаются открытыми и могут представлять интерес в дальнейших научных исследованиях (Крыжановская, 2008; Павловская, 2016, 2018). Изыскание продуцентов метаболитов, активных в отношении условно-патогенной и патогенной микрофлоры, повышает вероятность выявления новых уникальных биологически соединений. Оптимизация условий культивирования является эффективным способом повышения биосинтетической активности продуцентов биологически активных веществ, позволяет изучить и количественно оценить степень влияния одновременного действия нескольких факторов на синтез целевого продукта. (Четвериков, 2012; Корнеева, 2015).

Целью работы было определение среди растений и грибов перспективного продуцента, способного синтезировать биологически активные соединения с

бактериостатическим эффектом в отношении условно-патогенной и фитопатогенной микрофлоры. Создание биопрепарата для агротехнологического применения на основе бактериостатических метаболитов продуцента, отобранного в ходе скрининга.

Задачи исследования:

- оценить антибиотическую активность метаболитов растений и грибов в отношении условно-патогенных и фитопатогенных микроорганизмов;
- изучить влияние растительных и грибных метаболитов на МИК антибиотиков;
- изучить влияние растительных и грибных метаболитов на физиолого-биохимические свойства *E. coli*;
- подобрать субстрат для глубинного культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434;
- оптимизировать питательную среду и условия культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434;
- разработать лабораторный регламент получения биологически активных веществ из *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434;
- оценить биологическую активность и биобезопасность этилацетаного экстракта из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Научная новизна. Показана способность гречихи, овса, ячменя и грибов рода *Trichoderma* синтезировать вещества, обладающие антибиотической активностью в отношении условно-патогенной и фитопатогенной микрофлоры.

Установлен бактериостатический эффект экзометаболитов грибов рода *Trichoderma* и эндометаболитов сельскохозяйственных культур на физиолого-биохимические свойства *E. coli*.

Определены потенциальные мишени воздействия экзометаболитов грибов *Trichoderma* spp. и растительных эндометаболитов.

Экзометаболиты *T. atrobrunneum* обладают максимальной бактериостатической активностью.

Практическая значимость. Штамм – *T. atrobrunneum* депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ

F-1434, как продуцент биологически активных соединений, обладающих антигрибной и антибактериальной активностью.

Подобраны условия культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Разработана бактериостатическая композиция метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на основе Na-КМЦ против условно-патогенной микрофлоры.

Разработано средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта, патент №2016104159.

Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций по дисциплине «Медицинская биотехнология», «Технология антибиотиков» по специальности 19.03.01 - Биотехнология в ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина».

Положения, выносимые на защиту:

- результаты оценки биологической активности и специфичности растительных и грибных метаболитов обладают в отношении условно-патогенной и фитопатогенной микрофлоры;

- биофлавоноиды гречихи обладают прооксидантным действием на *E. coli*. Метаболиты *T. atrobrunneum* обладают выраженной бактериостатической активностью в отношении условно-патогенной микрофлоры, преимущественно влияют на функциональный статус клеточной стенки;

- результаты оптимизации условий культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для получения бактериостатических метаболитов;

- лабораторный технологический регламент получения бактериостатических метаболитов из *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434;

- бактериостатическая композиция метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на Na-КМЦ основе.

Апробация результатов исследований. Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на V Съезде биохимиков России (г. Сочи, 2016); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2018); на Всероссийской научно-практической конференции «Продовольственная безопасность: от зависимости к самостоятельности (Орел,

2018), на отчётных конференциях в ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет» (с 2013 по 2019 гг.).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 29 работ, в том числе 9 в изданиях, рекомендованных ВАК, получено 3 патента.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, характеристики объектов и методов исследований, четырех экспериментальных глав, выводов, библиографического списка и приложений. Работа содержит 144 страницы машинописного текста, 30 таблиц и 24 рисунка, 13 приложений. Библиография включает 189 наименований, из них 129 зарубежных источника

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дана общая характеристика работы, обоснована актуальность научного направления, показана практическая значимость и новизна полученных результатов, определены основные направления исследования.

В первой главе представлен анализ литературных данных о проблеме антибиотиков в мире. Описаны пути преодоления антибиотикорезистентности, источники биологически активных веществ. На основании анализа литературного обзора обоснована необходимость разработки технологических решений получения новых антибиотиков с целью использования в агротехнологиях.

Во второй главе изложены материальная часть, объекты и методы исследования.

В третьей главе приведены результаты и их обсуждение. На этапе скрининга бактериостатической активности наибольший интерес вызывали препараты метаболитов *T. atrobrunneum*, *T. lixii* Pat и биофлавоноидов гречихи (таблица 1).

Максимальный показатель коэффициента антибиотической активности определен у препарата метаболитов *T. lixii* Pat. Наибольший спектр действия в отношении представленных тест-культур имеет препарат биофлавоноидов гречихи. Препарат метаболитов *T. atrobrunneum* проявил активность в отношении *E. coli*, *S. enteritidis*, *K. pneumonia*, однако возбудители фитопатогенных заболеваний оказались к нему нечувствительны.

Таблица 1. Зоны подавления роста тест-культур

Препарат	Тест-культура								K _A
	E. coli ATCC 25922	S. enteritidis ATCC 13076	K. pneumonia ATCC 13883	C. albicans ATCC 10231	P. syringae	X. vesicatoria	A. cucumis	P. destructiva	
	Ø зоны подавления роста, мм								
<i>T. atrobrunneum</i>	23,6	22,3	23,8	6,0	6,0	6,0	6,1	6,3	12,5
<i>T. lignorum</i>	6,0	6,0	6,1	6,0	14,6	12,6	20,5	17,9	11,2
<i>T. lixii</i> Pat	21,2	19,2	21,5	6,0	25,4	24,9	26,5	25,8	21,3
<i>T. viride</i>	6,0	6,0	6,0	6,0	12,4	16,7	15,8	18,4	10,9
Биофлавоноиды	11,8	10,7	10,4	12,3	13,2	12,7	15,8	16,4	12,9
Дигидрокверцетин	8,5	9,9	7,1	6,2	9,7	10,1	6,4	6,7	8,8
Рутин	9,1	6,9	6,5	6,0	7,9	8,1	6,0	6,0	7,0
"Рутифлав"	9,2	8,8	8,3	7,1	10,3	12,5	9,8	8,4	9,3
Авенацин	6,7	7,4	7,1	6,0	6,7	7,4	6,0	6,0	6,6
Гордецин	7,2	6,8	7,5	6,0	7,2	6,8	6,0	6,0	6,6

В результате культивирования *E. coli* в средах с субингибирующей концентрацией препаратов, биофлавоноиды гречихи больше всех удлиняют lag-фазу, до 426 минут. Так же препарат снижает прирост биомассы 26,1-43,1% при варьировании температуры инкубации. При испытании осмотической резистентности *E. coli* препарат метаболитов *T. atrobrunneum* увеличил плазмолиз на 31,12%. Наиболее выраженное уменьшение адгезивности вызвал препарат метаболитов *T. atrobrunneum*: снижение ИАМ – на 35,5%, СПА – на 36,3%, КУЭ – на 9,91%.

При совместной инкубации с препаратами биофлавоноидов гречихи, гордецина, метаболитов *T. atrobrunneum* и *T. lixii* Pat снижались утилизация пептона среды и белок в экстракте биомассы, $r=0,847$, пропорционально удельной активности протеаз, $r=0,911$ и $r=0,909$, соответственно. Белковый спектр экстракта биомассы *E. coli* не изменен.

В экспериментах с препаратами биофлавоноидов гречихи, гордецина, метаболитов *T. atrobrunneum* и *T. lixii* Pat наблюдалось сокращение утилизации углеводного компонента среды удельной активности β -галактозидазы, $r=0,98$.

При совместной инкубации с дигидрокверцетином и рутином значения активности СОД и КАТ снижались на 17,8% и 4,6%; на 1,4% и 0,9% соответственно. В эксперименте с препаратом биофлавоноидов гречихи активность СОД и КАТ увеличилась в 12,8 и 8,37 раз, соответственно, на электрофореграмме образцов ДНК *E. coli* наблюдается фрагментация молекулы (рисунок 1).

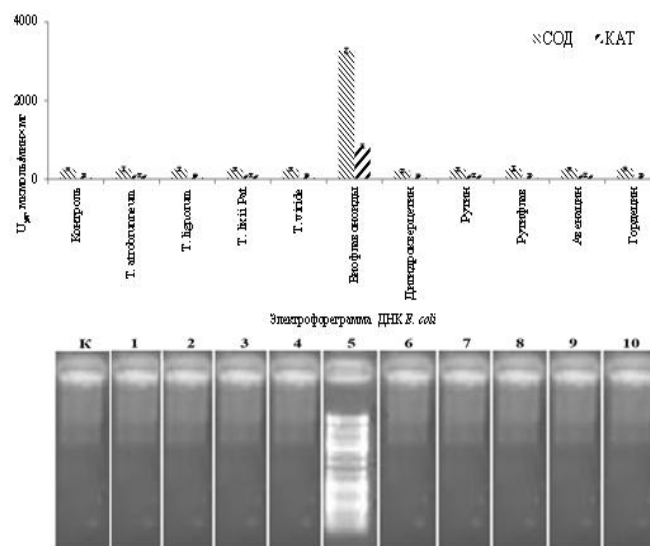


Рисунок 1 - Активность СОД и КАТ, электрофореграмма ДНК *E. coli*

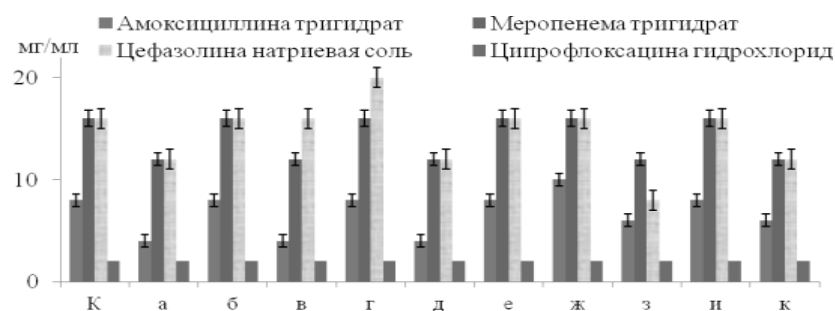


Рисунок 2 - Сравнение МИК β -лактамных антибиотиков при совместном инкубировании с препаратами: К – контроль, а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордец

Исследование влияния препаратов на МИК β -лактамных антибиотиков показало, что препарат метаболитов *T. lixii* Pat, *T. atrobrunneum*, "Рутифлав", биофлавоноиды гречихи, гордец снижают не 25 – 50% (рисунок 2).

Препарат метаболитов грибов *Trichoderma* spp. и биофлавоноидов гречихи использованы в составе средства для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта. Они оказывают защитно-стимулирующее действие, способствующее увеличению ростовой активности растений, защите их от болезней и вредителей и в конечном итоге повышению урожайности (таблица 2).

Таблица 2. Урожайность перца сорта «Калифорнийское чудо» и томатов сорта «Сердцеед»

Вариант	Урожайность		Растения, пораженные болезнью, %
	перец, т/га	томат, кг/м ²	
Контроль (без обработки)	46,8±3,1	2,1±0,2	5,7±0,6
Контроль («Эпин-Экстра»)	50,8±2,6	3,0±0,1	1±0,09
Предлагаемое средство	65,4±5,9	3,9±0,6	-

Анализ роста *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на плотных питательных средах показал, что самый быстрый рост наблюдался на среде Чапека – 70 ± 5 мм на 5 сутки инкубирования, к 7 суткам зарастает вся чашка Петри (90 мм) (рисунок 3). Была установлена зависимость диаметра колонии от pH питательной среды $r = 0,95$. Оптимальным pH для культивирования является 7,0.

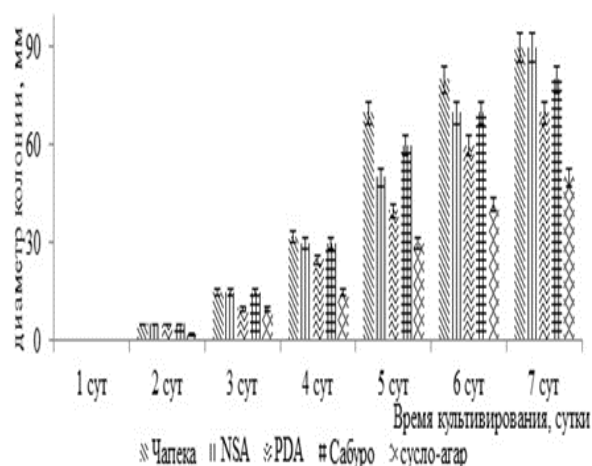
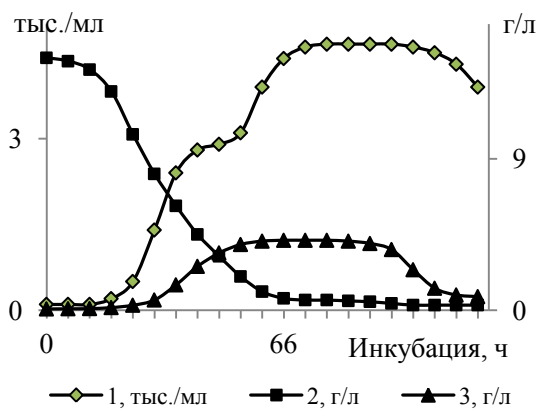


Рисунок 3 - Рост *T. atrobrunneum* на плотных питательных средах



$$Y = 32,425 - 0,565X_3.$$

Наибольшая синтетическая активность наблюдалась при культивировании с лимитированием по углеводному компоненту питательной среды, в течение 5 суток при температуре 28°C, с использованием посевной дозы продуцента 0,5% v/v (рисунок 5).

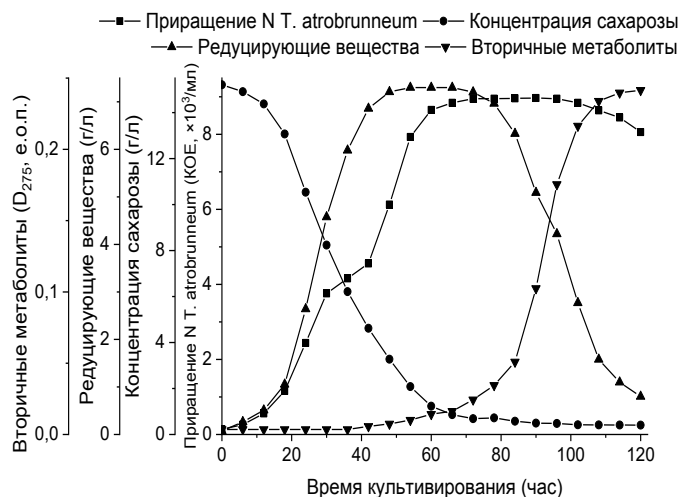


Рисунок 5 - Динамика культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

В главе 4 описан лабораторный технологический регламент получения биологически активных соединений из грибов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающих антибактериальной и антигрибной активностью (рисунок 6, 7).

ВР1. Подготовка оборудования и материалов. Стадия вспомогательных работ включает в себя санитарную обработку помещений, подготовку оборудования, материалов и воды. ТП. 2. Культивирование продуцента. Стадия культивирования продуцента включает в себя приготовление рабочих растворов, подача тепла, воды, пара; установление рабочих параметров, приготовление посевного материала. ТП. 3. Выделение целевого продукта. Стадия выделения целевого продукта включает в себя установление рабочих параметров скорости вращения, подвод культуральной жидкости к сепаратору, сепарирование, ультрафильтрация. ТП. 4. Очистка целевого продукта. Стадия очистки целевого продукта включает в себя установление рабочих параметров, экстрагирование этилацетатом 1:1, удаление полярной фазы. ТП. 5. Концентрирование. Стадия концентрирования включает в себя подвод полупродукта к испарителю, установление рабочих параметров, упаривание. ТП. 6. Готовая форма продукта. Стадия готовой формы продукта включает в себя восстановление в 60% этаноле. Характеристика готового продукта. Выход биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в лабораторных условиях составляет из расчета 3 л питательной среды 1,0026 мл концентрата.

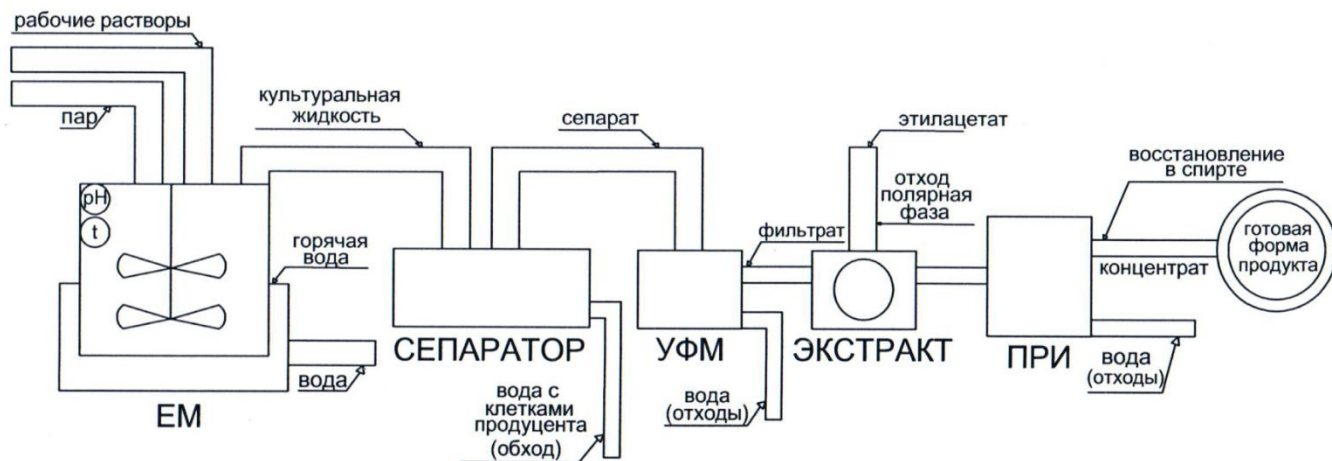


Рисунок 6 - Аппаратурная схема производства биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434



Рисунок 7 - Схема получения экзометаболитов из штамма *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

В главе 5 оценивается биологическая активность и биобезопасность этилацетаного экстракта из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Бактериостатические метаболиты *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 проявляют

выраженную антибиотическую активность в отношении как стандартных, так и клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* (1 и 2 мин при суспензионном методе; 2 и 3 мин при капельном методе; 26,1-26,5 мм у *E. coli* и 21,9-22,5 мм у *K. pneumoniae* при диффузии в агар).

В главе 6 приводится технология приготовления и применение бактериостатической композиции. Стерильный профильтрованный 0,5 % (w/v) раствор карбоксиметилцеллюлозы, с t 45 °С, асептически нагружали препаратом метаболитов до конечной концентрации 3 % (v/v), разливали в тубы.

Показано, что композиции с 0,5% стабилизатора оказывают бактериостатическое действие на стандартные штаммы бактерий *E. coli* и *K. pneumoniae* в месте контакта при экспозиции 1 мин., на клинические изоляты – 2 мин. Так же возможно комбинирование композиции (таблица 4).

Таблица 4. Время персистенции инфекционного агента и заживления инфицированной раны ($X_{cp} \pm \sigma$, сутки)

Культура тест-штамма	Контроль	Ципрофло- ксацин	БСК-На-КМЦ	Ципрофло- ксацин + БСК-На-КМЦ
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9,2±0,83	6,9±0,85	7,8±0,58	5,7±0,14
<i>E. coli</i> 11/1	8,4±0,12	6,0±0,23	6,9±0,43	4,7±0,39
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	9,6±0,54	7,5±0,57	8,6±0,69	6,8±0,78
<i>K. pneumoniae</i> 24/4	9,8±0,84	7,7±0,76	8,5±0,58	6,7±0,82
Образование рубца	17,2±1,14	15,7±0,83	16,1±0,74	14,5±0,55

Применение БСК-На-КМЦ в качестве монопрепарата сокращает персистенцию бактерий и, как следствие, ускоряет процесс формирования рубца, соответственно на 10,4-17,8% и 6,4%. В комбинации с ципрофлоксацином БСК-На-КМЦ повышает эффективность антибиотика на 9,3-21,6%.

ВЫВОДЫ

1. Растительные метаболиты обладают более высокой специфичностью в отношении фитопатогенной микрофлоры ($\varnothing > 12$ мм), метаболиты грибного происхождения дают лучшие результаты в экспериментах с условно-патогенными бактериями.

2. Установлено, что метаболиты *T. atrobrunneum*, «Рутифлав», экстракт биофлавоноидов из гречихи и гордецин способны увеличивать эффективность β -лактамных антибиотиков за счет снижения МИК в 1,5 – 2 раза.

3. Биофлавоноиды гречихи вызывают максимальное снижение прироста биомассы при варьировании температуры инкубации на 26,1-43,1%. Метаболиты *T. atrobrunneum* увеличивают плазмолиз на 31,12% на в нижнем диапазоне концентраций хлорида натрия. Метаболиты *T. atrobrunneum* наиболее выражено уменьшают адгезивность: ИАМ – на 35,5%, СПА – на 36,3%, КУЭ – на 9,91%. При совместном инкубировании с препаратами биофлавоноидов гречихи, гордецина, метаболитов *T. atrobrunneum* и *T. lixii* Pat наблюдалось резкое сокращение утилизации белкового компонента среды. Та же группа препаратов оказывает аналогичное действие на показатели утилизации источника углерода. Биофлавоноиды гречихи вызывают максимальное увеличение показателей антиоксидантной защиты.

4. Сахароза имеет наибольшее сродство с сахаролитическим комплексом *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 ($K_s = 0,202 \pm 0,18$ г/л), является наиболее подходящим углеводным компонентом питательной среды. В присутствии сахарозы отмечается максимальный прирост биомассы: $\mu_m = 0,089 \pm 0,01$ ч⁻¹, время генерации сокращено на 27,34%, метаболический коэффициент выше на 74,79% от среднего.

5. Наибольшая синтетическая активность *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 определяется при культивировании с лимитированием углеводного компонента питательной среды. Установлено, при концентрации сахарозы 15 г/л наблюдали максимальные значения диаметра зон подавления роста *E. coli*.

6. Разработан лабораторный регламент получения бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Оптимальный режим культивирования: сахароза 15 г/л; NaNO₃ 2 г/л; K₂HPO₄ 1 г/л; MgSO₄×7H₂O 0,5 г/л; KCl 0,5 г/л; FeSO₄ 0,01 г/л; посевная доза 0,5% v/v; перемешивание 120 мин⁻¹; время инкубации 5 суток; температура 28°C; сепарирование с частотой вращения 6000 мин⁻¹; ультрафильтрация; экстрагирование этилацетатом 1:1 в течение 180 минут; удаление водной фазы; упаривание до полного удаления растворителя при температуре 40±3 °C, с частотой вращения 60±5 мин⁻¹; восстановление в 60%

этаноле. Выход биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в лабораторных условиях составляет 1,0026 мл маслянистого концентрата из расчета 3 л питательной среды.

7. Экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 не токсичен, бактериостатическая композиция на КМЦ-основе признана микробиологически чистой, безвредной, с умеренной реактогенностью. Оптимальное содержание экстракта в бактериостатической композиции 3 % (v/v) в 0,5 % (w/v) растворе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. Данная композиция ингибирует рост культур *E. coli* и *K. pneumoniae* при экспозиции 1-2 мин. В комбинации с ципрофлоксацином БСК-Na-КМЦ повышает эффективность антибиотика на 9,3-21,6%.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. Павловская Н.Е. Перспективы применения мицелиальных грибов *Trichoderma* spp. в зоотехнии и ветеринарной медицине Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, О.А. Маркина, **А.В. Лушников** // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2016. – № 12. – С. 87 – 91.
2. Павловская Н.Е. Метаболиты грибов рода *Trichoderma* – перспективные компоненты микробиологических препаратов для агротехнологий / Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, В.Н. Дедков, Н.И. Ботуз, **А.В. Лушников**, О.А. Маркина // Вестник Орел ГАУ. – 2016. – №2 (59). – С.60-64
3. Гнеушева И.А. Чувствительность к антимикотикам микромицетов *Trichoderma* spp., перспективных продуцентов биологически активных соединений / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников** // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. – 2018. – № 4. - С. 46 – 51.
4. Гнеушева И.А. Антимикробная активность ветеринарных бактериостатических композиций на основе *Trichoderma harzianum* Rifai / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, Н.Е. Павловская // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. – 2018. - № 9. – С.65-74.
5. Гнеушева И.А. Антибактериальные эффекты БАВ различного происхождения и их сочетанного действия с некоторыми β-лактамами антибиотиками / И.А.

Гнеушева, Н.Е. Павловская, **А.В. Лушников** // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2018. – № 10. – С. 87 – 91.

6. Гнеушева И.А. Математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atrobrunneum* на питательной среде с различными углеводными компонентами / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, Н.Е. Павловская, О.А. Маркина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2018. Т. 14, № 3. – С. 13 – 18.

7. Гнеушева И.А. Биологическое обоснование применения микробных компонентов *Trichoderma* spp. *in vitro* для оздоровления овощных культур закрытого грунта от фитопатогенной инфекции / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, И.Ю. Солохина, **А.В. Лушников** // АгроЭкоИнфо. – 2019, №3.

8. Павловская Н.Е. Бактериостатический эффект низкомолекулярных соединений *Trichoderma lixii* (Pat.) / Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, О.А., Маркина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. Т. 22, № 2. – С. 3 – 8.

9. Гнеушева И.А. Определение оптимальной среды и условий глубинного культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, Н.Е. Павловская, О.А. Маркина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2019. Т. 15, № 1. – С. 10 – 16.

Публикации в других изданиях

10. Павловская Н.Е. Экзометаболиты *Trichoderma atrobrunneum* как потенциальные биохимические агенты в агротехнологиях / Н.Е. Павловская, **А.В. Лушников**, О.А. Маркина, М.А. Полякова, И.Ю. Солохина // Научные труды V съезда физиологов СНГ, V съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. – АСТА NATURAE /СПЕЦВЫПУСК том 2; под ред. А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили, А.Г. Габибова, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого. – 2016. – С. 214.

11. Павловская Н.Е. Влияние растительных и грибных метаболитов на удельную активность супероксиддисмутазы и каталазы *E.coli* / Н.Е. Павловская, **А.В. Лушников**, О.А. Маркина, М.А. Полякова, И.Ю. Солохина // Научные труды V

съезда физиологов СНГ, V съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. – АСТА NATURAE / СПЕЦВЫПУСК том 2; под ред. А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили, А.Г. Габибова, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого. – 2016. – С. 219.

12. Павловская Н.Е. Влияние растительных антибиотиков на МИК β -лактамных антибиотиков / Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, Л.В. Зомитева, И.Ю. Солохина // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: сборник, выпуск 17. ВГУ: 2015 г. - С. 152-154

13. Гнеушева И.А. Биологическая безопасность применения мицелиальных грибов *Trichoderma spp.* в современной биотехнологии / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, **А.В. Лушников**, О.Г. Карначева // Современные тенденции развития науки и технологий: материалы 13 международной научно-практической конференции (Белгород, 30 апреля 2016 года). №4-1. С. 100-101.

14. Гнеушева И.А. Антагонистический потенциал штаммов *Trichoderma spp.* в отношении возбудителей грибных и бактериальных заболеваний растений / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, И.Ю. Солохина, **А.В. Лушников**, С.В. Белая // В сборнике: Продовольственная безопасность: от зависимости к самостоятельности. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, 2017. С. 77-81

15. Павловская Н.Е. Применение БАВ природного происхождения и микробного синтеза в ветеринарии / Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, О.А. Маркина, **А.В. Лушников** // В сборнике: Продовольственная безопасность: от зависимости к самостоятельности. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, 2017. С. 85-88

16. Гнеушева И.А. Разработка средства для защиты овощных культур от комплекса патогенов на основе БАВ природного происхождения / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, И.Ю. Солохина, **А.В. Лушников** // Материалы Международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 23-25 мая 2018 г., г. Москва: [сборник]. М.: ООО «РЭД ГРУПП». – 2018. – С.678-680

17. Маркина О.А. Оценка токсичности экзометаболитов *Trichoderma harzianum* в опытах *in vitro* и *in vivo* / О.А. Маркина, И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников** // В сборнике: Современный агропромышленный комплекс глазами молодых ученых.

Материалы научно-образовательной школы аспирантов Ассоциации аграрных вузов Центрального Федерального округа России. 2017. С.86-89.

18. Гнеушева И.А. Разработка средства для защиты овощных культур от комплекса патогенов на основе БАВ природного происхождения / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, И.Ю. Солохина, **А.В. Лушников** // Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы международного форума, 2018. С. 664-666

19. Гнеушева И.А. Оценка биологической активности бактериостатической композиции на основе *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для ветеринарии / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, О.А. Маркина // В сборнике: Современные аспекты биобезопасности продукции животноводства. Материалы всероссийской научно-практической конференции, 2018. С. 25-29

20. Павловская Н.Е. Биологическая активность бактериостатических метаболитов на основе *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 / Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, О.А. Маркина // В сборнике: Микробные технологии в птицеводстве и животноводстве. Материалы всероссийской научно-практической конференции, 2018. С. 27

21. Гнеушева И.А. Получение бактериостатических композиций на основе *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для ветеринарии / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, **А.В. Лушников**, И.А. Пантюшин // В сборнике: Микробные технологии в птицеводстве и животноводстве. Материалы всероссийской научно-практической конференции, 2018. С. 27

22. **Лушников А.В.** Комплексные препараты на основе БАВ растительного и микробного происхождения для современных агротехнологий / А.В. Лушников, И.А. Гнеушева // В сборнике: Производство и переработка сельскохозяйственной продукции: менеджмент качества и безопасности. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 25-летию факультета технологии и товароведения Воронежского государственного аграрного университета имени императора Петра I, 2018. С. 36-38

Патенты

23. Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта: патент на изобретение № 2626174 РФ.: Заявка: 2016104159,

09.02.2016 Опубликовано: 21.07.2017 Бюл. № 21.— 9 с. Н.Е. Павловская, И.Н. Гагарина, Д.Б. Бородин, И.Ю. Солохина, И.А. Гнеушева, Е.В. Костромичева, **А.В. Лушников**, Т.С. Рожкова

24. Штамм *Trichoderma atrobrunneum*, обладающий антибактериальной активностью в отношении *Bacillus anthracis*: патент на изобретение № 2710783 РФ.: Заявка: 2019102438, 29.01.2019 Опубликовано: 13.01.2020 Бюл. № 2 Н.Е, Павловская, И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**, О.А., Маркина

25. Линимент ранозаживляющий, содержащий бактериостатические метаболиты *T. atrobrunneum* F-1434 и сумму биофлавоноидов гречихи: патент на изобретение №2719723 РФ.: Заявка: 2019121127 03.07.2019 Опубликовано: 22.04.2020 Бюл. № 12 Н.Е, Павловская, И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников**

Национальное депонирование

26. Национальное патентное депонирование №1434. Культура *Trichoderma atrobrunneum* 14 Дата депонирования 4 мая 2018 года. ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. Н.В. Парахина». Продукт, продуцируемый штаммом (область применения): Биологически активные соединения, обладающие антигрибной и антибактериальной активностью. Регистрационный номер ВКПМ: F-1434.

Учебно-методические пособия

27. Механизмы биосинтеза антибиотиков: учебно-методическое пособие по дисциплине «Технология антибиотиков» для обучающихся по направлению подготовки 19.03.01 - Биотехнология / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, А.В. Лушников, О.А. Маркина // Издательство Орловского ГАУ, 2017, 94 с.

28. Агробиологическое обоснование технологии выращивания овощной продукции с применением биологических средств защиты: Монография / Н.Е. Павловская, И.Н. Гагарина, Д.Б. Бородин, И.А. Гнеушева, И.В. Горькова, И.Ю. Солохина, А.В. Лушников и др.// Издательство Орловского ГАУ, 2018, 194 с.

Подписано в печать _____.2020 г.

Объем 1,0 усл.п.л. Заказ 81. Тираж 100 экз.

Отпечатано в издательстве Орел ГАУ, 2020, Орел, бульвар Победы, 19