



На правах рукописи

Лушников Алексей Валерьевич

**Бактериостатическая композиция
в составе метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника**

1.5.6 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Москва – 2024

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

Научный руководитель: **Гнеушева Ирина Алексеевна**
кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

Официальные оппоненты: **Шарова Наталья Юрьевна**
доктор технических наук, профессор РАН заместитель директора по научной работе ВПИИ пищевых добавок - филиал ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН

Тремасова Анна Михайловна
доктор биологических наук, заведующая отделением биотехнологии, ведущий научный сотрудник лаборатории ветеринарной биотехнологии ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНВИ»)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет»

Защита диссертации состоится «11» июня 2024 года в 13 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 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 «__» _____ 2024 года

Учёный секретарь диссертационного совета 99.0.027.03

кандидат технических наук, доцент

Ирина Васильевна Шакир

Актуальность исследования. Метабиотики – это пробиотические препараты метаболитного типа, действующим веществом которых являются структурные компоненты пробиотических микроорганизмов или их метаболитов, обладающие способностью оптимизировать некоторые специфичные физиологические функции организма хозяина, связанные с деятельностью индигенной микробиоты. В отличие от препаратов, содержащих живые микроорганизмы, метабиотики более стабильны при хранении, не утрачивают биологической активности при комбинации с антибактериальными препаратами и в проксимальных отделах пищеварительного тракта, не участвуют в развитии инфекционных процессов, позволяют организовать массовый тип применения.

Метабиотики воздействуют на микроорганизмы биологически активными субстанциями продуцента. Наибольший интерес вызывают бактериоцины – специфические белки, подавляющие жизнедеятельность клеток как родственных, так и чужеродных штаммов микроорганизмов. Одной из разновидностей таких веществ являются пептаиболы – мембранно-активные линейные пептиды с широким спектром действия в отношении бактерий, грибов, опухолевых клеток, обладающих низкой токсичностью.

Механизм действия пробиотических препаратов метаболитного типа основан на взаимодействии субстанциями микробного продуцента, выделяемыми в процессе жизнедеятельности, на патогенные или условно-патогенные микроорганизмы. Вследствии чего у них нарушается структура и/или функции, что приводит к угнетению роста чувствительной культуры.

Например, для коррекции микробиоценоза пищеварительного тракта и стимуляции иммунной системы при заболеваниях крупного рогатого скота, свиней и птицы разработана конкурентоспособная технология получения ветеринарных пробиотических препаратов на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454 Д «Бацинил» и «Бацинил-К». Данные препараты характеризуются высокой антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Salmonellas* sp. – возбудителей инфекционных болезней животных, а технология их получения имеет высокую эффективность и является энергосберегающей, безотходной. «Симбиолакт» - смесь культур пробиотических и молочнокислых микроорганизмов: *Lactobacillus paracasei* LC-01™, *Lactobacillus acidophilus* LA-5®, *Lactococcus lactis* R-707-1™, *Bifidobacterium* BB-12®.

Надо сказать, что сдерживание использования в пробиотических препаратах спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* вызывается трудностью очистки, поэтому в настоящее время изыскиваются микробные продуценты БАВ с высокой биологической

активностью. К ним относятся и грибы рода *Trichoderma*, в процессе своей жизнедеятельности, выделяющие различные метаболиты, которые благодаря своей полифункциональности, обеспечивают лидирующее положение среди других микробных продуцентов.

Степень проработки темы диссертационного исследования. Существенный вклад в исследование пробиотических препаратов внесли М.Д. Ардатская, Л.А. Неминущая, П.А. Красочко, Курочкин, Б.А. Шендеров; в исследование биологической активности грибов рода *Trichoderma* и создание биопродукции на их основе - российские и зарубежные исследователи: А.В. Александрова, Ф.К. Алимова, J.A. Bissett, I.S. Druzhinina, В.С. Садыкова, G.T. Harman, Н.Е. Павловская.

Таким образом, в связи с вышесказанным **цель** данной диссертационной работы – разработка бактериостатической композиции на основе биологически активных веществ грибов рода *Trichoderma* spp. для применения в составе метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника животных.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. отобрать перспективный штамм-антагонист *Trichoderma* spp. в отношении представителей кишечного микробиоценоза и провести его молекулярно-генетическую идентификацию, изучить биохимические и культуральные свойства, подобрать условия культивирования продуцента;
2. подобрать условия извлечения БАВ штамма-продуцента, изучить их физические, химические и биологические свойства, оптимизировать условий получения с целью максимального накопления;
3. разработать технологии получения биопродукции на основе БАВ штамма-продуцента;
4. разработать метод оценки качества и контроля количественного состава БАВ штамма-продуцента в биопродукции;
5. подтвердить коррекцию микробиоценоза кишечника разработанным метабиотиком в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна. Впервые обосновано применение биологически активных соединений гриба *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в отношении представителей кишечного микробиоценоза в составе ветеринарного метабиотика.

Для продуцента разработаны оригинальная питательная среда и оптимальные условия культивирования.

Путем математического моделирования и оптимизации получен экстракт

культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, установлен состав, природа и бактериостатическая активность, специфичность экстракта и его компонентов.

Разработана технология получения бактериостатической композиции и метабиотика на ее основе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты исследования подтверждают перспективность использования бактериостатических соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в создании средств коррекции микробиоценоза кишечника животных.

Штамм *Trichoderma harzianum* Rifai Б/л 14 депонирован в Биоресурсный Центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика как *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Разработан лабораторный регламент на производство бактериостатической композиции на основе экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Разработан лабораторный регламент на производство экстракта биомассы консорциума *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus*.

Разработан комплект документации на производство комбинированного метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника.

Разработан метод определения массовой доли экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в составе биопродукции.

Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций по дисциплинам «Медицинская биотехнология», «Технология антибиотиков» студентам направления подготовки 19.03.01 – Биотехнология в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина» Министерства науки и высшего образования РФ.

Положения, выносимые на защиту. Закономерности роста продуцента на оригинальной питательной среде, в оптимизированных условиях культивирования с максимальным выходом бактериостатических соединений.

Критерии подлинности экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на основании комплексного изучения его физических, химических, биологических свойств.

Метод определения массовой доли экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в составе биопродукции.

Технологии получения бактериостатической композиции и метабиотика для

коррекции микробиоценоза кишечника животных.

Результаты коррекции микробиоценоза кишечника экспериментальных животных полученным метабиотиком в опыте *in vivo*.

Личный вклад автора. Личный вклад заключается в формировании цели и задач диссертации, проведении лабораторных культивирований, обработке и анализе полученных результатов, проведении математических расчетов, обсуждении результатов, формулировке выводов, написании публикаций по теме диссертационного исследования и представлении на международных и всероссийских конференциях.

Степень обоснованности и достоверность результатов работы. Степень достоверности подтверждается достаточно большим количеством экспериментов как стандартных, общепринятых, так и специальных биохимических, физико-химических, биотехнологических, микробиологических методов исследования с детальным описанием методик постановки, что обеспечивает возможность воспроизведения полученных результатов и подтверждения их достоверности. Научные результаты экспериментальных данных обработаны методами математической статистики, на основании чего положения и выводы по результатам следует считать аргументированными, обоснованными и достоверными.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы были доложены на XIII Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий» (Белгород, 2016); Всероссийской научно-практической конференции «Продовольственная безопасность: от зависимости к самостоятельности» (Орёл, 2017); Всероссийской научно-практической конференции «Микробные технологии в птицеводстве и животноводстве» (Казань, 2018); Международной научно-практической конференции «Производство и переработка сельскохозяйственной продукции: менеджмент качества и безопасности» (Воронеж, 2018); Всероссийской научно-практической конференции «Современные аспекты биобезопасности продукции животноводства» (Орёл, 2018); Международной научно-практической конференции «Пищевая индустрия в современных условиях: тренды и инновации» (Орёл, 2023); на II Национальной научно-практической конференции «Передовые научно-технические проекты в биотехнологии» (Орёл, 2023); Международной научно-практической конференции «Научные исследования - сельскохозяйственному производству» (Орёл, 2023).

Соответствие паспорту научной специальности. Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 – Биотехнология: п. 3 «Микробная и клеточная биотехнология»; п. 9 «Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм,

комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней»; п. 25 «Технологии биологически-активных соединений и биопрепаратов»; п. 29 «Оценка безопасности, качества и функционального потенциала биотехнологических штаммов-продуцентов. Молекулярно-генетическое маркирование штаммов – продуцентов. Методы контроля подлинности биотехнологических продуктов».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 21 печатная работа, из них 8 публикаций в журналах, рекомендованных к изданию ВАК, 9 – в материалах конференций различного уровня, 1 патентное депонирование штамма, 3 патента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературных источников, включающего 268 наименований, в том числе 105 иностранных, 36 таблиц, 32 рисунка, 14 приложений. Работа выполнена при поддержке гранта Фонда содействия развития малых форм предприятий в научно-технической среде – программы «У.М.Н.И.К.» 2014-2016 гг.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность, цель, задачи, научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе приведен обзор литературы, отражающий сведения о составе микробиоценоза кишечника в норме и патологии, применении микроорганизмов как источников БАВ, препараты для коррекции состава микробиоценоза кишечника при дисбиотических расстройствах, в том числе для ветеринарии.

Во второй главе изложена экспериментальная часть, описаны объекты, оборудование и реактивы, методы исследования.

В третьей главе описывается обоснование выбора микробного продуцента бактериостатических соединений, определение состава питательной среды и условий его культивирования. Спектр антагонизма штаммов рода *Trichoderma* определяли против облигатных, факультативных и патогенных представителей кишечного микробиоценоза. Эффективность исследуемых штаммов *Trichoderma* spp. оценивали по коэффициенту антибиотической активности; восприимчивость тест-культур к исследуемым штаммам – по коэффициенту чувствительности. Критерием выбора продуцента БАВ и тест-культуры был коэффициент наилучшего взаимодействия, выраженный отношением K_A и K_S . Штаммы рода *Trichoderma* обладают антагонизмом в отношении Грам- микроорганизмов, проявляя слабый антагонизм со средним K_A 10,81: *T. harzianum* Rifai Д 2 – 10,79; *T. harzianum* Rifai Д 15 – 10,8;

T. harzianum Rifai Д 25 – 10,78; *T. harzianum* Rifai Б/л 14 – 10,91; *T. harzianum* Rifai Б/л 18 – 10,74; *T. harzianum* Rifai Б/л 20 – 10,82. По критериям оценки чувствительности, полученные результаты испытания Грам- тест-культур (включая контроли) в среднем относятся к категории «средняя чувствительность», со средним K_S 16,19: *E. coli* ATCC 25922 – 19,06; *H. alvei* ATCC 11604 – 18,04; *K. pneumoniae* ATCC 27736 – 16,31; *P. vulgaris* ATCC 49132 – 13,87; *S. enteritidis* ATCC 13076 – 14,8; *Y. enterocolitica* ATCC 23715 – 15,12. Наибольшее значение K_A 10,91 определено у *T. harzianum* Rifai Б/л 14. Наибольшее значение K_S 19,06 *E. coli* ATCC 25922. Штамм *T. harzianum* Rifai Б/л 14 был идентифицирован как *Trichoderma atrobrunneum* и депонирован НИЦ «Курчатовский институт - ГосНИИгенетика», регистрационный номер ВКПМ F-1434.

Для изучения культуральных свойств *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 микромицет выращивали на универсальных питательных средах для культивирования грибов: «Чапек» –

CZA, «обедненный синтетический агар» – NSA, «картофельно-декстрозный агар» – PDA, «сусло агар» – WA, «Сабуро» – SDA. Среды готовили в соответствии общепринятым рецептурам. В ходе эксперимента определили зависимость диаметра колонии гриба от pH среды, $r =$

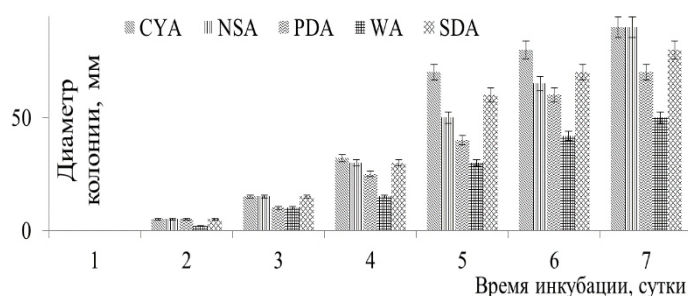


Рисунок 1. Рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на плотных средах

0,889 (рисунок 1). На среде Чапек, имеющей $pH = 7,3$, за сутки инкубирования диаметр колонии увеличивается на $14,0 \pm 5$ мм, краев чашки достигает на 7 сутки. Мицелий белого цвета до 2 мм в высоту, образование конидий обильное, концентрическими зонами.

Оптимальный субстрат для культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 определяли среди веществ, которые ассимилируются грибом (таблица 1).

Таблица 1. Субстраты, ассимилируемые *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅
Глицерин	Ксилит	D-мальтоза	D-мелибиоза	D-трегалоза	Сахароза	D-галактоза	D-глюкоза	L-арабиноза	L-аргинин	L-глутамат	L-малат	Na-цитрат	D-галактуронат	D-глюкуронат

Размерность выборки понижали с помощью исключаящего эксперимента, где субстраты являлись факторами, параметр оптимизации – диаметр недельной колонии гриба. Наибольший прирост биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 отмечался в опытах с D-трегалозой; сахарозой; D-глюкозой; L-аргинином; Na-цитратом, из которых карбоновые кислоты приняли за факторы роста, для углеводов определяли параметры роста культуры.

Критерием выбора субстрата использовали метаболический коэффициент (q), так как он позволяет рассчитать посевную дозу продуцента под навеску субстрата (рисунок 2).

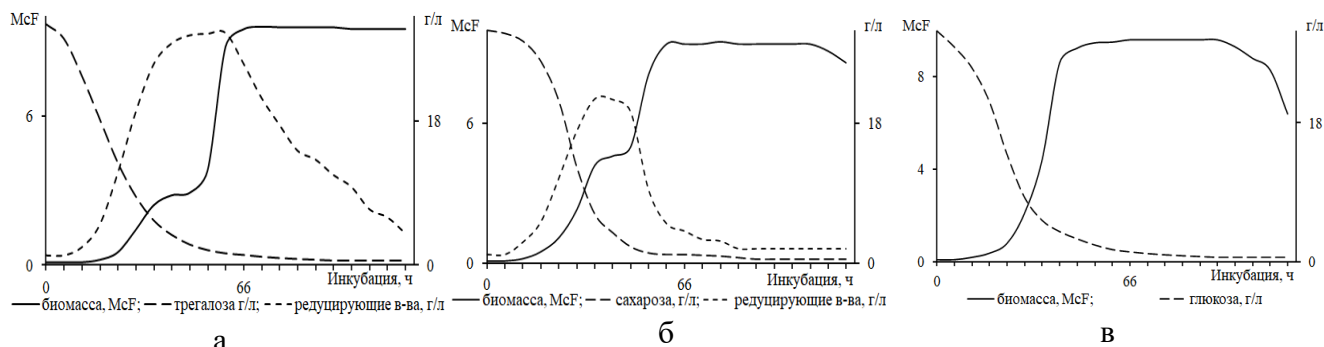


Рисунок 2. Влияние субстрата на рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434:

а – трегалоза; б – сахароза; в – глюкоза.

Наибольшая величина метаболического коэффициента установлена в опыте с сахарозой, $q = 0,059$ г/КОЕ \times ч \times л. Максимальная скорость (V_m) ассимиляции сахарозы при оптимальной температуре 31 $^{\circ}$ С составляет 70,58 г/ч \times л.

Продуктивность БАВ *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 оценивали по чувствительности тест-культур при совместной инкубации с продуктами культивирования гриба (рисунок 3).

Культуральная жидкость продуцента имеет выраженный антагонизм к чувствительным тест-культурам, замедляя их рост. Наименьшего значения показатель достиг в опыте с БАВ после гетерофазного глубинного культивирования – замедление роста на 80%.

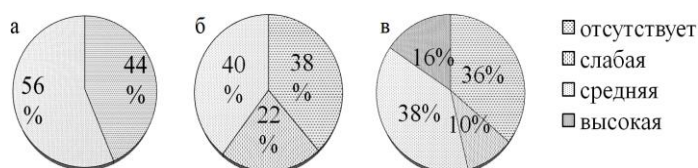


Рисунок 3. Чувствительность тест-культур к продуктам культивирования:

а – твердофазное культивирование;
б – гетерофазное поверхностное;
в – гетерофазное глубинное

Выделение БАВ *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающих антагонизмом в отношении чувствительных тест-культур, производили одноступенчатой смесительно-отстойной экстракцией, за счет 180 минут массообмена между равными объемами культуральной жидкости и этилацетата. Органический слой отделяли и концентрировали в ротационном испарителе при температуре 37 \pm 0,5 $^{\circ}$ С, с частотой вращения 60 \pm 5 мин $^{-1}$ до получения маслянистой жидкости. Экстракт замораживали при -58 $^{\circ}$ С и сушили до полного удаления этилацетата в лиофильной сушке с давлением 2,5 \times 10 $^{-3}$ бар, доводя температуру до 20 $^{\circ}$ С естественным путем. Абсолютно сухой экстракт имеет вид хлопьев, матовых с вариацией цвета от желто-оранжевого до коричневого, температура плавления 118 \pm 2 $^{\circ}$ С, элюотропный ряд представлен на рисунке 4. Из абсолютно сухого экстракта готовили стандартный образец, для чего навеску экстракта растворяли в 96% этаноле в соотношении 1 мл спирта на 1 мг сухого экстракта. Стандартный образец экстракта имеет плотность 0,8350 г/см 3 ; коэффициент преломления 1,3602; удельный показатель поглощения 625 (рисунок 5).

Компоненты экстракта, обладающие бактериостатической активностью определяли на газоне чувствительных тест-культур биоавтографией хроматограммы, полученной по принципу распределительной хроматографии: подвижная фаза – гексан : ДМСО - 6:4, неподвижная фаза – силикагель, импрегнированный метанолом при давлении $2,5 \times 10^{-3}$ бар. Среднее значение R_f $0,44 \pm 0,0097$. Из экстракта были изолированы три фракции, обладающие бактериостатической активностью, однако они проигрывают оригинальному экстракту по значению коэффициента антибиотической активности: «1» -25%; «2» -38%; «3» -41%, а так же их комбинации (1:1): «1+2» -12%, «1+3» -19%, «2+3» -31%; (1:1:1): «1+2+3» -3%. Это говорит о нецелесообразности фракционирования экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Максимальный выход бактериостатических БАВ достигнут при культивировании *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в оптимизированных условиях по методу Бокса – Уилсона, который включал полный факторный эксперимент Гаусса – Зейделя с применением ортогонального центрального композиционного плана и оптимизацию по типу крутого восхождения, таблица 2. Факторы варьирования: X_1 – посевная доза *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, ед. мутности McF; X_2 – время инкубации, сутки; X_3 – концентрация сахарозы, г/л. Параметр оптимизации – диаметр зоны подавления роста тест-культуры, мм.

В четвертой главе описывается разработка технологии получения биопродукции на основе экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Для перевода экстракта в водорастворимую форму готовили бактериостатическую композицию. Стабильная, однородная система с максимальным высвобождением бактериостатических

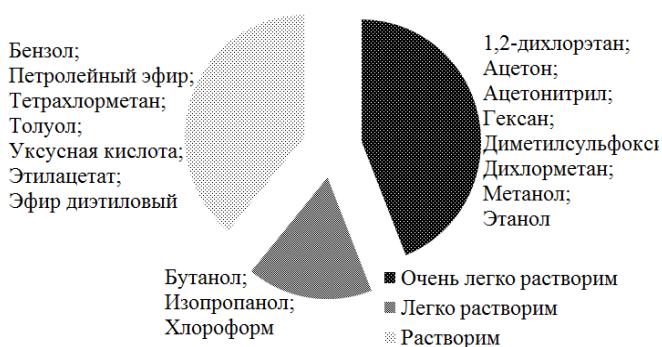


Рисунок 4. Элюотропный ряд экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

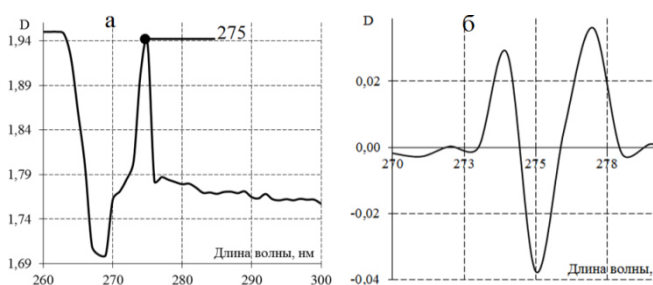


Рисунок 5. Оптические характеристики экстракта
 а – УФ-спектр и максимум поглощения;
 б – вторая производной спектра

Таблица 2. Расчет и реализация крутого восхождения

Уровень	Фактор			Отклик		σ	
	x_1	x_2	x_3	мысленный \bar{y}_j , мм	реализованный \bar{y}_j , мм		
Нижний, $min x_j$	1	1	15	-	-	-	
Верхний, $max x_j$	2	7	30	-	-	-	
Базовый, $0 x_j$	1,5	4	22,5	-	-	-	
Интервал, Δx_j	0,5	3	7,5	-	-	-	
Коэффициенты, b_j	-1,56	-1,73	-2,38	-	-	-	
Пропорциональность, θ	0,66	0,73	1	-	-	-	
Шаг по градиенту, δx_j	0,51	3,78	17,84	-	-	-	
Эксперимент	1x_j	2,01	7,78	40,34	26,75	22,11	1,27
	2x_j	2,53	11,57	58,17	14,31	19,22	1,20
	3x_j	3,04	15,35	76,01	1,86	-	-

компонентов достигается за 10 минут акустического диспергирования экстракта в 0,5% растворе Na-КМЦ при амплитуде колебаний звука 15 мк с частотой 23 кГц. Технологическая схема производства бактериостатической композиции представлена на рисунке 6. Экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и бактериостатическая композиция были испытаны по ГОСТ 31647-2012, ГОСТ 31926-2013, ОФС 1.7.2.0001.15 и признаны нетоксичными, безвредными. Бактериостатическая композиция нашла применение в составе препарата для коррекции микробиоценоза кишечника, который представляет собой иммобилизованный на матрице из гидролизного лигнина метабитик, содержащий комплекс экстрактов из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ здоровых поросят-отъемышей: *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus*. На рисунках 7, 8 представлены схемы производства.

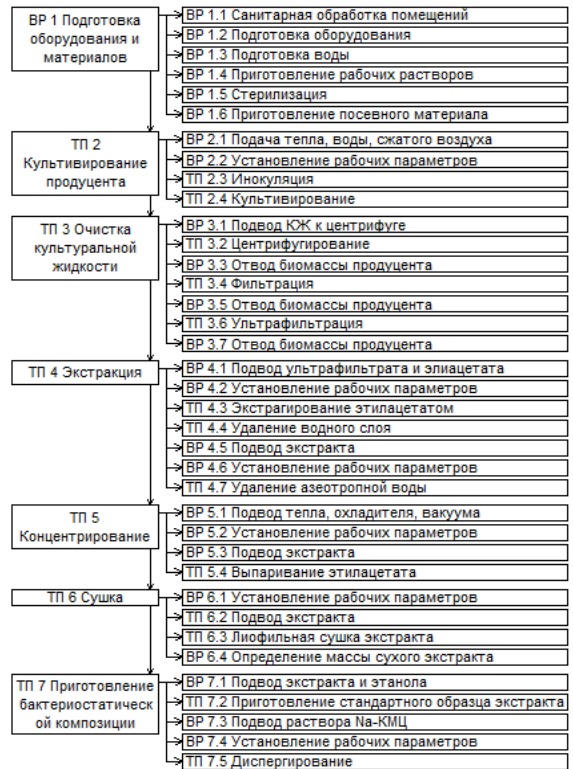


Рисунок 6. Технологическая схема производства бактериостатической композиции.

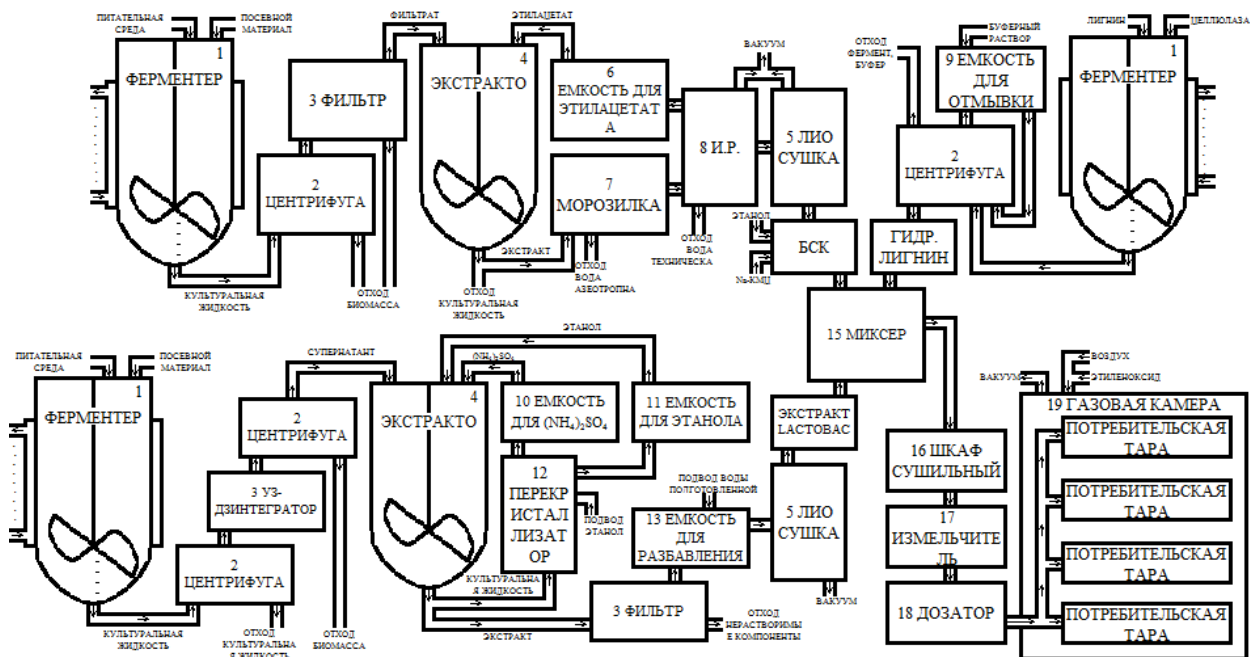


Рисунок 7. Аппаратурная схема производства метабитика

Метабитик для коррекции микробиоценоза кишечника имеет вид крупного порошка светло-коричневого цвета со специфическим запахом и сладковатым привкусом. Препарат не содержит живых, ослабленных или убитых микроорганизмов и/или их структур.

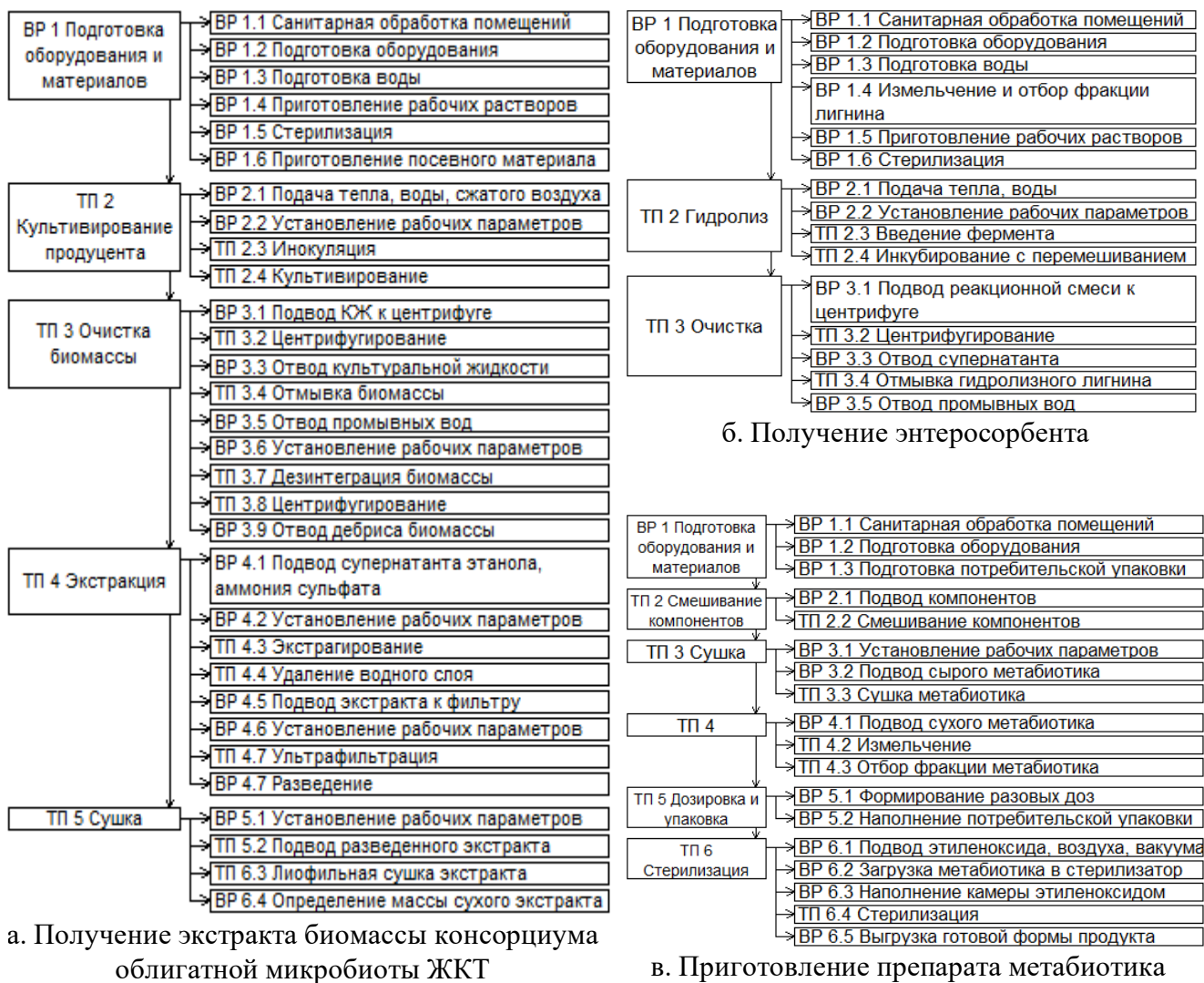


Рисунок 8. Технологические схемы получения компонентов и препарата метабιοтика.

Для контроля производства и готовой биопродукции была разработана методика определения массовой доли экстракта *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 с помощью УФ-спектрофотометрии, рисунок 9. В линейном диапазоне массовую долю рассчитывали по формуле: $X = \frac{D_{275} \times K_d \times 100}{m_{\text{практ}} \times l \times A_{1\text{ см}}^{1\%} \times (100 - W)}$,

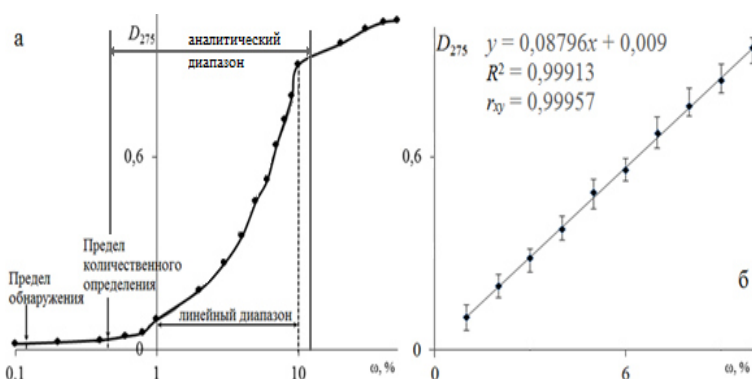


Рисунок 9. Зависимость оптической плотности от массовой доли экстракта (а – общий вид графика; б – линейный диапазон)

где: D_{275} – оптическая плотность испытуемого раствора; K_d – коэффициент разведения; $m_{\text{практ}}$ – масса сухого экстракта, г; l – длина оптического пути, см; $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения; W – потери, %. Потери определяли разностью теоретической массы экстракта в

исследуемом продукте и массой экстракта, полученной после извлечения из продукта и сушки: $W_r = m_{\text{теор}} - m_{\text{прак}}$; выражали в процентах, в пересчете на теоретическую массу:

$$W(\%) = \frac{W_r \times 100}{m_{\text{теор}}}$$

Применение метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника не исключает использование других лекарственных средств, в том числе ряда антибиотиков. Увеличение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам вызвано синергизмом с экстрактом культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, рисунок 10. Предлагаемый метабиотик применяется перорально, способом индивидуальной или групповой дачи, при введении в общий рацион с кормами, кормовыми ингредиентами и водой или в качестве компонента при производстве комбикормов, концентратов, премиксов. Нормы дачи или ввода в рацион подбираются индивидуально. Препарат полностью сохраняет активность при однократном цикле замораживания-размораживания.

Способность метабиотика избирательно корректировать состав микробиома кишечника доказана при испытаниях на кроликах, распределенных в 3 группы по 10 в каждой: I – контроль – получали стандартный корм; II и III – вводили в суточный рацион по 10% препарата «Симбиолакт» и предлагаемого метабиотика, соответственно. Состав микробиома представлен на рисунке 12.

В опыте с препаратом «Симбиолакт» отмечается увеличение биомассы микроорганизмов относительно контроля: в 28-38 раз Грам+, и в 10 раз Грам-. Клостридии, *E.coli* лак- и неферментирующие оказались индифферентны к препарату. В опыте с предлагаемым метабиотиком отмечается как увеличение, так и уменьшение

биомассы микроорганизмов относительно контроля: количество типичных *E. coli* и *E. coli* лак- сократилось в 74 и 4 раза соответственно; Грам+ выросли в 47-63, что в среднем в 1,6 раз больше чем в опыте с препаратом «Симбиолакт», однако число клостридий сократилось на 60%. Неферментирующие оказались индифферентны и к предлагаемому метабиотику. Это

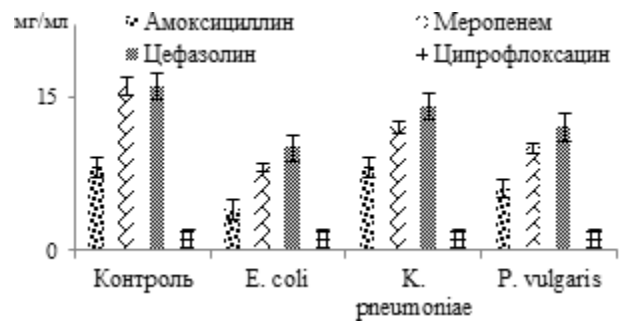


Рисунок 10. Чувствительность тест-культур к β -лактамым антибиотикам в комбинации с экстрактом культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

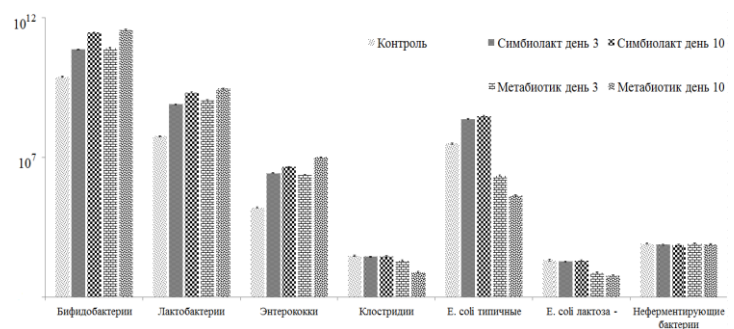


Рисунок 12. Качественный и количественный состав основной микрофлоры толстого кишечника, КОЕ/г фекалий

позволяет рекомендовать предлагаемый метабиотик для видоспецифичной коррекции микробиоценоза кишечника.

ВЫВОДЫ

1. Наибольшее значение коэффициента антибиотической активности 10,91 определено у *T. harzianum* Rifai Б/л 14. Наиболее чувствительным штаммом оказался *E. coli* ATCC 25922 с максимальной зоной угнетения роста - Ø 18,89 ±0,53 мм и коэффициентом чувствительности 19,06. Штамм *T. harzianum* Rifai Б/л 14 был идентифицирован как *Trichoderma atrobrunneum* и депонирован в Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт - ГосНИИГенетика»), регистрационный номер F-1434. Синтезирует ферменты лейцинариламидазу, β-N-ацетилглюкозаминидазу, γ-глутамилтрансферазу, PNP-N-ацетил-β-D-галактозаминидазу. Оптимальная питательная среда для накопления биомассы – модифицированная CZA («Чапека»): сахароза – 30; Na₂NO₃ – 2,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄×7H₂O – 0,5, KCL – 0,5; FeSO₄ – 0,01; L-аргинин – 1,0; Na-цитрат – 1,0. Оптимальной температурой культивирования является 31°C, pH 7,3.

2. Наибольшие диаметры зон угнетения роста чувствительных тест-культур определяются при совместном инкубировании с БАВ, полученными при трехчасовом экстрагировании этилацетатом из равного объема культуральной жидкости от гетерофазного глубинного культивирования продуцента. *Внешний вид*: абсолютно сухой экстракт имеет вид хлопьев, матовых с вариацией цвета от желто-оранжевого до коричневого. *Температура плавления* = 118±2°C. *Растворимость*: очень легко растворим в 1,2-дихлорэтане, ацетоне, ацетонитриле, диметилсульфоксиде, дихлорметане, метаноле, этаноле; легко растворим в бутаноле, изопропанолем, хлороформе; растворим в бензоле, петролейном эфире, тетрахлорметане, толуоле, уксусной кислоте, этилацетате, эфире диэтиловом. *Плотность* ρ₂₀ = 0,8350 г/см³. *Коэффициент преломления* n_D²⁰ = 1,3602. *Максимум поглощения* λ_{max} = 275 нм. *Удельный показатель поглощения* A_{1 см}^{1%} = 625. Экстракт имеет белковую природу; установлено наличие триптофана и аргинина. Проявляет бактериостатический тип активности, специфичен в отношении Грам- бактерий группы *Enterobacteriaceae*. Максимальное угнетение роста тест-культур достигается при совместном инкубировании с экстрактом культуральной жидкости, полученной при культивировании *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в оптимизированных условиях: сахароза – 40,34; Na₂NO₃ – 2,0; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄×7H₂O – 1,0; FeSO₄ – 0,001; факторы роста – L-аргинин, Na-цитрат – по 1,0; посевная доза продуцента 2,01 McF; температура 31°C; pO₂ ≥80%; pH 7,3±0,2; продолжительность культивирования 7,78 суток ≈ 187 часов; перемешивание и аэрация на автоматическом

регулировании под контролем программы ферментера.

3. Разработан метабиотик для коррекции микробиоценоза кишечника. Технология получения метабиотика состоит из 4 этапов: I – Получение бактериостатической композиции на основе экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Этап состоит из 7 стадий, включая 1 вспомогательные работы и 6 технологических процессов: Подготовка оборудования и материалов; Культивирование продуцента; Очистка культуральной жидкости; Экстракция; Концентрирование; Сушка; Получение готовой формы продукта. Выход абсолютно сухого экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 составил 0,8371 г из 3 литров питательной среды. Готовая бактериостатическая композиция имеет бледно-желтый оттенок, прозрачна и/или слегка опалесцирует. маслянистой консистенции со специфическим запахом. II – Получение экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ. Этап состоит из 5 стадий, включая 1 вспомогательные работы и 4 технологических процесса: Подготовка оборудования и материалов; Культивирование продуцента; Очистка биомассы; Экстракция; Сушка. III – Получение энтеросорбента. Этап состоит из 3 стадий, включая 1 вспомогательные работы и 2 технологических процессов: Подготовка оборудования и материалов; Гидролиз; Очистка. IV – Приготовление метабиотика. Этап состоит из 6 стадий, включая 1 вспомогательные работы и 5 технологических процессов: Подготовка оборудования и материалов; Смешивание компонентов; Сушка; Измельчение; Дозировка и упаковка; Стерилизация. Готовый метабиотик содержит 1 часть бактериостатической композиции, 2 части экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ, 30 частей энтеросорбента. Препарат имеет вид порошка светло-коричневого цвета со специфическим запахом и сладковатым привкусом, размер частиц ≤ 140 мкм.

4. Разработан метод определения массовой доли экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в биопродукции. Метод включает 3 этапа: I - Извлечение из биопродукции (экстракция этилацетатом; упаривание; перекристаллизация в системе 96% этанол : вода – 1:1; сушка; стандартизация 96% этанолом). II – УФ-спектрофотометрия (экстинкцию образца измеряли при длине волны 275 нм, в кювете с длиной оптического пути 1 см против 96% этанола). III – Определение массовой по формуле:
$$X = \frac{D_{275} \times K_d \times 100}{m_{\text{практ}} \times l \times A_{1\text{ см}}^{1\%} \times (100 - W)}$$
 Линейность $r = 0,99957$; $R^2 = 0,99913$; предел обнаружения 0,147%; предел количественного определения 0,446%; аналитический диапазон 0,446% до 12%. Правильность, сходимость и воспроизводимость соответствовали критериям приемлемости, следовательно метод можно считать пригодным для достоверной оценки состава биопродукции.

5. Экспериментально подтверждено изменение состава микробиоценоза кишечника в опытах *in vitro* и *in vivo*. Установлена специфичность биологической активности предлагаемого метабиотика в отношении представителей микробиоценоза кишечника. Для кроликов со средней массой тела 4 кг разовая доза предлагаемого метабиотика более чем в 8 раз дешевле, при этом эффективность в 1,6 раз выше, чем у коммерческого препарата «Симбиолакт». Это дает основание рекомендовать метабиотик для коррекции микробиоценоза кишечника в целях профилактики и лечения дисбиотических расстройств ЖКТ бактериальной этиологии; минимизировать применение антибиотиков; нормализовать микробиоценоз кишечника после антибактериальной терапии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Гнеушева И.А. Математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atroviride* 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.
2. 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.
3. Гнеушева И.А. Определение оптимальной среды и условий глубинного культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *Trichoderma atroviride* 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.
4. **Лушников А.В.** Кинетические характеристики расщепления сахарозы в экстракте биомассы *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434 / А.В. Лушников, И.А. Гнеушева, И.Ю. Солохина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2020. Т. 16, № 3. – С. 31 – 35.
5. Гнеушева И.А. Обоснование применения энтеросорбентов на базе недревесного растительного сырья в ветеринарной практике / И.А. Гнеушева, И.Ю. Солохина, **А.В. Лушников**, Н.Ю. Агеева // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2022. Т. 18, № 3. – С. 14 – 19.
6. Гнеушева И.А. Подбор оптимального состава питательной среды и условий глубинного культивирования микробного продуцента бактериостатических соединений /

И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников** // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2023. Т. 19, № 1. – С. 15 – 24.

7. Гнеушева И.А. Определение источника и подбор режима экстрагирования метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающих антибиотической активностью в отношении представителей группы *Enterobacteriaceae* / И.А.Гнеушева, **А.В. Лушников**, С.Н. Коношина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. Т. 26, № 7. – С. 20 – 25.

8. Гнеушева И.А. Разработка показателей качества экстракта культуральной жидкости *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. Т. 26, № 12. – С. 40 – 48.

Публикации в других изданиях

9. 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.

10. 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

11. 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

12. **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

13. 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.

14. Гнеушева И.А. Получение пробиотических кормовых продуктов из отходов сельскохозяйственного производства / И.А.Гнеушева, **А.В. Лушников** // В сборнике: Пищевая индустрия в современных условиях: тренды и инновации. Сборник научных статей Международной научно-практической конференции. Орел, 2023. С. 355-360.

15. Гнеушева И.А. Получение энтеросорбентов на основе растительного сырья / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников** // В сборнике: Научные исследования - сельскохозяйственному производству. Материалы II Международной научно-практической Интернет-конференции. Орел, 2023. С. 90-93.

16. **Лушников А.В.** Роль метабитиков в коррекции микробиоценоза кишечника / А.В. Лушников, И.А. Гнеушева // В сборнике: Передовые научно-технические проекты в биотехнологии. Материалы II Национальной научно-практической Интернет-конференции по актуальным проблемам в области биотехнологии. Орел, 2023. С. 140.

17. Гнеушева И.А. Пробиотики, пребиотики, синбиотики: их роль в современной медицине / И.А. Гнеушева, **А.В. Лушников** // В сборнике: Передовые научно-технические проекты в биотехнологии. Материалы II Национальной научно-практической Интернет-конференции по актуальным проблемам в области биотехнологии. Орел, 2023. С. 135-139.

Патенты на изобретения

18. Национальное патентное депонирование. Культура *Trichoderma atroviride* 14. Дата депонирования 4 мая 2018 года. ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. Н.В. Парахина». Продукт, продуцируемый штаммом: Биологически активные соединения, обладающие антигрибной и антибактериальной активностью. Регистрационный номер ВКПМ: F-1434 / Павловская Н.Е., Александрова А.В., Гнеушева И.А., **Лушников А.В.**

19. Патент 2626174 РФ. Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта / Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Бородин Д.Б., Солохина И.Ю., Гнеушева И.А., Костромичева Е.В., **Лушников А.В.**, Рожкова Т.С.

20. Патент 2785674 РФ. Средство для предпосевной обработки семян ярового ячменя и озимой пшеницы / Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Горькова И.В., Гнеушева И.А., **Лушников А.В.**, Агеева Н.Ю.

21. Патент 2719723 РФ. Линимент ранозаживляющий, содержащий бактериостатические метаболиты *T. atroviride* F-1434 и сумму биофлавоноидов гречихи / Павловская Н.Е., Гнеушева И.А., **Лушников А.В.**

Подписано в печать ____ . ____ . 20 ____ г.
Формат 60x90/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 1,0. Заказ 81. Тираж 100 экз.
Отпечатано в издательстве ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ»
г. Орел, бульвар Победы, 19