

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ.Н.В.ПАРАХИНА»

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)

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель д.б.н., проф.

Павловская Нинэль Ефимовна

ОРЕЛ–2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Проблема антибиотиков в мире.	14
1.2. Основные механизмы резистентности бактерий	16
1.2.1. Представители резистентных бактерий	18
1.2.2. Пути преодоления антибиотикорезистентности	19
1.3. Сельскохозяйственные культуры – источник биологически активных метаболитов	22
1.3.1. Вторичные метаболиты высших растений, биологическая роль.	22
1.3.2. Флавоноиды гречихи	24
1.3.3. Гордецин ячменя	24
1.3.4. Авенацин овса	27
1.3.5. Механизм устойчивости растений к возбудителям заболеваний.	28
1.3.6. Грибы рода <i>Trichoderma</i> – источник биологически активных соединений	31
1.3.7. Биологический контроль в сельскохозяйственном производстве	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	38
2.1. Объекты исследования	38
2.2. Материальная часть.	38
2.2.1. Реактивы.	38
2.2.2. Оборудование.	39
2.3 Методы исследования	39
2.3.1 Микробиологические методы	39
2.3.1.1. Получение мицелия <i>Trichoderma</i> spp.	39
2.3.1.2. Получение экстрактов биомассы микроорганизма.	40
2.3.1.3. Определение чувствительности к антибиотическим препаратам и минимальной ингибирующей концентрации по МУК 4.2.1890-04.	40

2.3.1.4. Биоавтография.	41
2.3.1.5. Определение осмотической резистентности.	41
2.3.1.6. Определение адгезивных свойств по Брилис (1986).	41
2.3.1.7. Формулы расчета основных кинетических характеристик роста микроорганизмов.	42
2.3.2. Биохимические методы.	42
2.3.2.1. Определение активности ферментов.	42
2.3.2.1.1. Определение активности β -галактозидазы по Craven (1965).	42
2.3.2.1.2. Определение протеазной активности по Anson (1939).	42
2.3.2.1.3. Определение активности супероксиддисмутазы по McCord & Fridovich (1969)	43
2.3.2.1.4. Определение активности каталазы по Beers & Sizer (1952)	43
2.3.2.2. Количественное определение субстратов.	43
2.3.2.2.1. Количественное определение общего содержания углеводов по Dubois et al. (1956).	43
2.3.2.2.2. Количественное определение сахарозы	43
2.3.2.2.3. Количественное определение общего содержания белка Bradford (1976).	44
2.3.2.2.4. Количественное определение пептона в питательной среде	44
2.3.3. Молекулярно-биологические методы.	44
2.3.3.1. Определение резистентности к антибиотикам.	44
2.3.4. Электрофорез белков в редуцирующих условиях по Laemmli (1970).	45
2.3.5. Биотехнологические методы.	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	48
3.1. Бактериостатические свойства растительных и грибных метаболитов в отношении <i>E. coli</i> АСТТ 25922 и их МИК.	48
3.2. Влияние растительных и грибных метаболитов на МИК β -лактамных антибиотиков.	50

3.3. Влияние растительных и грибных метаболитов на устойчивость <i>E. coli</i> к действию факторов среды:	52
3.3.1. Термолабильность	52
3.3.2. Осмотическая резистентность.	52
3.4. Влияние растительных и грибных метаболитов на адгезивные свойства <i>E. coli</i> .	53
3.5. Влияние растительных и грибных метаболитов на алиментарную активность <i>E. coli</i> :	54
3.5.1. Утилизация белкового компонента среды	54
3.5.2. Утилизация углеводного компонента среды;	55
3.6. Влияние растительных и грибных метаболитов на антиоксидантный статус бактериальной клетки	56
3.7. Применение растительных и грибных метаболитов в составе средства для предпосевной обработки семян.	58
3.8. Подбор субстрата для глубинного культивирования <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434	60
3.9. Оптимизация питательной среды и условий культивирования <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434.	70
3.10. Влияние экстрагентов на антибиотическую активность метаболитов <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434.	72
ГЛАВА 4. ЛАБОРАТОРНЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ГРИБОВ <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И АНТИГРИБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.	75
4.1. Нормативные ссылки	76
4.2. Термины, определения, сокращения.	77
4.3. Характеристики биологически активных соединений	78
4.4. Технологическая схема производства БАС	79

4.5. Аппаратурная схема производства	80
4.6. Субстраты и материалы.	81
4.7. Изложение технологического процесса	84
4.8. Материальный баланс.	88
4.9. Контроль производства.	89
4.10. Методы и средства контроля.	90
4.11. Требования безопасности и промышленной санитарии.	91
4.12. Производственная санитария.	92
4.13. Техника безопасности.	95
4.14. Технологические затраты на получение биологически активных соединений <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434.	96
4.15. Технические требования.	97
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БИОБЕЗОПАСНОСТИ ЭТИЛАЦЕТАНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНО ЖИДКОСТИ <i>T. ATROBRUNNEUM</i> ВКПМ F-1434 С ЦЕЛЬЮ ОБОСНОВАНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗООТЕХНИИ И ВЕТЕРИНАРИИ	99
ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ И ГРИБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СОСТАВЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ	102
ГЛАВА 7. ВЫВОДЫ	105
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	108
9.ПРИЛОЖЕНИЯ	130

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

EAEC – энтероадгезивная кишечная палочка

McF – стандарт мутности по McFarland

NSA – обедненный синтетический агар

PDA – картофельно-декстрозный агар

SDS – додецилсульфат натрия

VIM, CTX-M, TEM – маркеры устойчивости к антибиотикам

БРО – буфер для разведения образца

БФС – бромфеноловый синий

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КАТ – каталаза

КЖ – культуральная жидкость

КОЕ – колониеобразующая единица

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РВ – редуцирующие вещества

СОД – супероксиддисмутаза

ТАЕ – Трис-ацетат-ЭДТА

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной задачей современной биологии и биотехнологии является разработка, изучение и поиск новых биологически активных веществ природного происхождения, для использования их в агротехнологиях, в частности, для лечения инфекционных заболеваний животных и против возбудителей заболеваний сельскохозяйственных 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 Н.Е. и др., 2012; Горькова И.В., 2002; Гнеушева И.А., 2010; Солохина И.Ю., 2013; Костромичева Е.В., 2013)

В последние годы грибы рода *Trichoderma* spp. привлекают внимание исследователей как продуценты различных БАВ, в том числе с противоопухолевой, противовирусной, антимикробной и иммуномодулирующей активностью (Druzhinina, 2016; Hermosa, 2016; Алимова, 2016). Наряду с этим они продуцируют антибиотические соединения (алкилпирины и др.), подавляющие развитие возбудителей грибных и бактериальных болезней растений.

Во всем мире активно изучается новая группа природных пептидных антибиотиков – пептаиболов. Это мембранно-активные линейные пептиды, содержащие диалкиламинокислоты и аминокислоты. Они обладают широким спектром действия в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий, фитопатогенных и патогенных грибов, опухолевых клеток и характеризуются низкой токсичностью. За последние годы большой прогресс был сделан в понимании биологической активности и определении структуры пептаиболов [4, 29].

Несмотря на то, что различными авторами накоплено большое количество данных по использованию метаболитов *Trichoderma* spp., вопросы об их использовании в качестве медицинских агентов в биоконтроле

инфекционных заболеваний животных и фитопатогенной инфекции растений остаются открытыми и могут представлять интерес в дальнейших научных исследованиях (Крыжановская, 2008; Павловская и др., 2016, 2018).

Одним из плодотворных подходов при проведении поисковых исследований продуцентов биологически активных вторичных метаболитов является скрининг изолятов уже известных видов микромицетов, а также подбор оптимальных условий культивирования их культивирования, что значительно повышает вероятность выявления новых уникальных биологически активных соединений, активных в отношении условно-патогенной и патогенной микрофлоры.

Оптимизация питательной среды методами математического планирования эксперимента, позволяющая не только изучить одновременное действие не определенного количества факторов на интересующий процесс, но и произвести количественную оценку степени этого влияния, является эффективным способом повышения биосинтетической активности микробных продуцентов биологически активных веществ [54, 56].

Актуальность темы исследования определяется необходимостью поиска новых эффективных средств против болезней животных и сельскохозяйственных растений.

Целью данной работы являлось исследование бактериостатических и фунгицидных свойств активных метаболитов гречихи, ячменя, овса и штаммов *Trichoderma* spp. на модельном объекте *E. coli* для создания биопрепаратов.

В задачи исследования входило:

- 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.

Федеральная Целевая программа и Перечень Критических Технологий РФ, утверждённые Указом Президента РФ от 7 июля 2011 г. № 899 (пункт №8 «Нано-, био, информационные, когнитивные технологии», предполагает необходимость разрабатывать различные методы, включающие сравнительные, структурные, статистические.

Научная новизна.

- Показана способность гречихи, овса, ячменя и грибов рода *Trichoderma* синтезировать вещества, обладающие антибиотической активностью в отношении условнопатогенной 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 и теоретическая значимость работы. В результате скрининга отобран штамм из рода *Trichoderma* spp., продуцирующих внеклеточные антибиотические соединения гидрофобной природы, активные в отношении условно-патогенных микроорганизмов, которые могут быть использованы в дальнейших разработках антибиотических препаратов для ветеринарии. Отобранный штамм – *T. atrobrunneum* депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов как продуцент биологически активных соединений, обладающих антигрибной и антибактериальной активностью, присвоен номер ВКПМ F-1434. Установлено отсутствие токсичности образуемого этим штаммом антибиотического комплекса веществ по отношению к организму млекопитающих. Подобраны оптимальные параметры культивирования штамма *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Разработана бактериостатическая композиция метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на основе Na-КМЦ, обладающая выраженной антимикробной активностью против условно-патогенной микрофлоры в индуцированных ранах. Разработано средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта, патент РФ №2626174. Материалы диссертации используются в ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина» при чтении лекций по дисциплинам «Технология антибиотиков» и «Медицинская биотехнология» по специальности 19.03.01 – «Биотехнология»

Положения, выносимые на защиту:

- Биофлавоноиды гречихи индуцируют окислительный стресс *E. coli*.
- Метаболиты *T. atrobrunneum* нарушают функциональный статус клеточной стенки *E. coli*.
- Оптимизированы условия культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для получения бактериостатических метаболитов: 5 суток при

температуре 28°C, с использованием посевной дозы продуцента 0,5% v/v, концентрация сахарозы 15 г/л.

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

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

Апробация результатов исследований. Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на V Съезде биохимиков России (Сочи, 2016); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2018 г.); 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 2018 гг.).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 21 печатная работа, в том числе 7 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ; 1 патент РФ, 1 заявка на патент (№); 1 национальное патентное депонирование штамма; 2 учебно-методических пособия; 1 монография.

Структура и объём работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, характеристику объектов и методологию 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 138 зарубежных источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Введение.

Проблема устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, включая антибиотики, на глобальном уровне впервые рассматривалась в докладе всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2014 г. Эти случаи включают существенную устойчивость *E. coli* к цефалоспорином и фторхинолонам третьего поколения — двум важнейшим и широко используемым типам противобактериальных лекарственных средств [104].

В связи с этим ведется широкий поиск новых антимикробных соединений, в список которых входят активные метаболиты растительных клеток (вторичные вещества), которые можно либо выделять из клеток, либо синтезировать на основании выявленной химической структуры [48]. Такой интерес к растительным антимикробным веществам вызван не только необходимостью поиска новых активных антибиотиков, но и необходимостью для сельскохозяйственного производства. Так, необходимо найти или создать биологические пестициды, способные заменить химические средства защиты растений, применяемые в борьбе с патогенами, и защиты от экологического загрязнения. На основе растительных метаболитов необходимо создавать комплексные препараты избирательного действия и сочетающие в себе ростактивирующие, защитные, антистрессовые инсектицидные и фунгицидные свойства [8, 28, 162, 164].

Известно, что в растениях синтезируется немало различных соединений, обеспечивающих такую широкую защиту [48]. К таким соединениям относятся прежде всего фенольные, биологическое действие которых обширно [46]. Известно, что флавоноиды оказывают бактерицидное действие на клетки *Escherichia coli* [46].

Среди сельскохозяйственных растений особенно обширным составом фенольных соединений, включая и витамин рутин, обладает гречиха

посевная (*Fagopyrum Mill*). Из материала ряда публикаций известно, что в периферической части зерна ряда злаковых культур (овса, ржи, пшеницы) также содержатся вещества флавоноидной природы, защищающие от микроорганизмов [20, 48].

Так, из корней ячменя в 1963 году было выделено антибиотическое вещество, которое придавало устойчивость овса к грибу *Ophiobolus graminis*, вызывающему корневую гниль пшеницы и ячменя (Майзель (Maizel) и Буркхард (Burkhardt)). Впоследствии это вещество было названо авенацином.

Авенацин в концентрации до 50 мкг/мл подавлял грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, бактерии и грибы, среди которых были сапрофитные и патогенные для растений, животных и человека: *Mycobacterium tuberculosis*, *Verticillium albo-atrum*, *Neurospora crassa* и др., всего 13. [48]

Ленинградские ученые Новотельный Н.В. и Ежов И.С., обнаружили в ячмене вещество, обладающее широким спектром антибактериального и микоцидного действия [39, 43].

Костромичевой Е.В. из зерна ячменя и Солохиной И.Ю. из корней овса выделены антибиотические вещества гордецин и авенацин, обладающие фунгицидной активностью по отношению к возбудителям болезней ячменя и овса [24, 48].

Вместе с тем, в настоящее время важное хозяйственное значение в связи с широким использованием имеют грибы рода *Trichoderma* для получения ферментов, биологически активных веществ и препаратов для защиты растений [2, 109, 178].

Благодаря своему высокому антагонистическому действию микромицет триходерма используется как основа для производства препаратов для сельского хозяйства. Широкое распространение получили *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, которые способны подавлять более 60 видов фитопатогенов (*Fusarium*, *Phoma*,

Botrytis, *Ascochyta*, *Alternaria* и др.) на широком спектре растений (овощные, цветочно-декоративные, зерновые и зернобобовые культуры). Микроорганизм безвреден для теплокровных животных, полезной энтофауны и пчел, не вызывает ожогов у растений.

В опытах *in vivo* и *in vitro* у *Trichoderma* ssp. выявлен целый спектр экзометаболических фитогормонов, органических кислот, витаминов и свыше 100 антибиотиков, среди которых глиовирин, глизопренины, виридин, дикетопиперазины, сесквитерпены, стероиды и другие. Грибы рода *Trichoderma* широко используются в сельскохозяйственном производстве в связи с фунгицидным и антибактериальным действием [1, 91].

1.1. Проблема антибиотиков в мире.

В настоящее время ведется работа по поиску новых антимикробных препаратов и методов лечения, связанных с распространением устойчивых бактерий и отсутствием новых лекарственных средств, особенно для лечения грамотрицательных инфекций. Имеющиеся вещества или схемы лечения, способные преодолеть резистентность к антибиотикам, основаны на геномном подходе, что дает возможность открытия новых препаратов влияющих на устойчивость. Понимание иммунных отношений между микроорганизмами и хозяевами способствует внедрению других методов, которые могли бы пересилить стойкость микроорганизмов к антибиотикам. Средство к клеточным мишеням бактерий, также физические и изменяющиеся параметры являются ключевыми элементами рационального подхода подбора новыми антибиотических соединений против грамотрицательных бактерий или организмов, [31, 140]. В 1868 году получен первый антибиотик, чему послужило открытие антагонизма некоторых грибов и бактерий [14].

На сегодняшний день разнообразие представителей царства *Mycota*, составляет 98000 видов [127], синтезирующих 30000 веществ, среди которых 15000 являются биологически активными. В течение последних 80 лет

достигнуты революционные успехи в клинической и фундаментальной медицине, создано большое количество лекарств на основе продуктов вторичного метаболизма некоторых грибов (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*, *Aspergillus flavus* et all.; цефалоспорины (*Acremonium acremonium*), фумагиллин (*A. fumigatus*), гризеофульвин (*P. nigricans*, *P. urticae griseofulvum*), трихотецин (*Trichothecium roseum* (Pers.) и др. [28].

Одним из мировых лидеров на медицинском рынке остаются β -лактамы антибиотики (пенициллины и цефалоспорины), которые впервые появились в конце 1970-х годов. Их доля в общем объеме продаж антибиотиков во всем мире составила 65%, а уровень выручки от продаж в 2002 году составил в районе \$15 000 000 000 США. С открытием циклоспорина началась новая эра иммунологии, фармакологии и трансплантологии. Циклоспорин и ряд близких по структуре аналогов (циклоспорины А, В, С, U, V, W) продуцируют мицелиальные грибы *Tolypocladium inflatum*, *Trichoderma polysporum*, *Cylindrocarpon lucidum*. Он представляет собой циклический полипептид, состоящий из 11 аминокислотных остатков. Интерес к этой группе антибиотиков вызван, помимо не очень высокой антибактериальной активности, циклоспорин-специфическим иммуносупрессивным эффектом [28, 99].

Уже сейчас в качестве продуцента около 700 последовательностей пептидов идентифицированы 18 родов несовершенных грибов и грибов аскомицетов. Большинство соединений были обнаружены у грибов *Trichoderma* spp. и их телеоморфы *Hypocrea*, а также грибов *Acremonium* spp., *Tolypocladium* spp., *Paecilomyces* spp., *Emericellopsis* spp. и *Sepedonium* spp. [28].

1.2 Основные механизмы резистентности бактерий

Различают ферментативные и неферментативные механизмы устойчивости к противомикробным препаратам. Неферментативный

включает нарушение трансмембранной проницаемости и элиминирование субстрата из клеток. β -лактамы, относящиеся к гидрофильным антибиотикам, проникают через заполненные водой каналы поровых белков, потеря которых, вызванная мутацией, повышает резистентность, так же как и питательные вещества не проникают в клетки, особенно при низких концентрациях [150, 155]. Ферментативный механизм обусловлен способностью микроорганизмов синтезировать энзимы, действующие непосредственной на антибиотик, обеспечивающие горизонтальный перенос детерминант устойчивости как внутри, так и между видами [140, 166].

β -Лактамы. Резистентность бактерий к β -лактамам антибиотикам обусловлена четырьмя классами β -лактамаз: А, В, С и D. В настоящее время бактерии, несущие гены ESBL (Extended-spectrum beta-lactamase) типов SHV или TEM, достаточно широко распространены. β -лактамазы, класса А, наиболее часто встречаются у *K. pneumoniae* и *E. coli*. [80] Так же известны редко встречающиеся ESBL типов PER и VEB [77, 135, 149]. Обычное расположение генов, кодирующих ESBL, на плазмидах по соседству с генами, отвечающими за резистентность к аминогликозидам, тетрациклинам, левомицетину и т.д. [148]. В настоящее время присутствие металло- β -лактамаз (класс В) наиболее часто определяются у *K. pneumoniae*, кодируются плазмидами. MBL гидролизуют все β -лактамы, в том числе, карбапенемы (кроме азтреонама) [78, 184]. AmpC β -лактамазы – индуцибельные цефалоспорины, отвечающие за резистентность к пенициллинам, цефалоспорином. В случае отсутствия хромосомных AmpC, бактерии приобретают данный признак с плазмидами, получая при этом иные гены резистентности, в том числе и SHV, TEM, VIM, CTX [123]. В Европейских странах стали широко распространены oxacillin-hydrolyzing β -lactamase класса D. Большинство из этих ферментов кодируются плазмидами, легко передаются между бактериями. Гидролизуют цефалоспорины III-IV

поколения, карбапенемы и не ингибируются клавулатом и тазобактамом [31, 122].

Аминогликозиды. Механизм резистентности обусловлен ферментативными модификациями молекулы антибиотика (аминогликозидфосфорилтрансферазы (APH), аминогликозидаденилтрансферазы (AAD) и аминогликозидацетилтрансферазы (AAC)), снижая его сродство к 30S субъединице рибосом, либо метилированием 16S рРНК (16S рРНК метилтрансферазы). [31, 175, 181].

Фторхинолоны. Механизм резистентности обусловлен модификацией ДНК-гиразы. В результате мутаций *GyrA/GyrB* генов синтезируются ферменты, низкоафинные к фторхинолонам за счет изменений аминокислотных последовательностей субъединиц А и В. Так же известны примеры резистентности, вызванные модификаций топоизомеразы IV, либо комбинацией этих явлений. [31, 122, 158]

В случае борьбы с микроорганизмами, обладающими множественной лекарственной устойчивостью в качестве препаратов, сохранивших антибактериальную активность все чаще применяют колистин и тигециклин. Однако в последние годы описываются случаи формирования устойчивости у ранее чувствительных к этим препаратам штаммов. Механизм резистентности к колистину обусловлен мутациями в генах, кодирующих биосинтез компонентов липополисахарида, за счет чего снижается сродство колистину мембране [31, 61, 112, 147].

Пониженная чувствительность к тигециклину вызвана эффлюксом RND-типа, в частности AcrAB комплекс является основой резистентности энтеробактерий приводящей к устойчивости к антибиотикам, красителям, моющим средствам [31, 170, 179].

1.2.1. Представители резистентных бактерий

P. aeruginosa. Имеет практически все известные механизмы устойчивости к антибиотикам, за счет конститутивных (плохо проницаемая мембрана, широкий диапазон субстратной специфичности, β -лактамазы) и/или приобретенных детерминант резистентности. Нечувствительна к цефалоспорином I-II поколения [31, 168].

Acinetobacter sp. Неферментативная резистентность обусловлена: системой RND AdeABC, элиминирующей β -лактамы, тетрациклины, аминогликозиды, макролиды, фторхинолоны, левомецетины, тигециклины, карбапенемы, RND AdeIJK – тигециклин и миноциклин; изменениями проницаемости наружной мембраны, и сродства пенициллинсвязывающих белков [31, 88, 159]. Ферментативная резистентность обусловлена β -лактамазами. ESBL резистентность к пенициллинам и цефалоспорином расширенного спектра действия отвечают: TEM, SHV, VEB и GES; узкого спектра действия – AmpC-цефалоспориноназы, ADC (*Acinetobacter derived cephalosporinases*). Имеется большая сложность фенотипически различить наличие AmpC и ESBL, довольно часто наблюдается присутствие обоих признаков [31, 87, 157].

Бактерия *K. pneumoniae*, используя механизмы ESBL (SHV, CTX-M, TEM, PER), AmpC, включая MBL, приобретает устойчивость к цефотаксиму и цефтриаксону, которые являются самыми результативными антибиотиками, относящимися к β -лактамазам. У *K. pneumoniae* ESBL+, наблюдается к хинолонам, ощутимо большая устойчивость к фторхинолонам по сравнению с ESBL- штаммами. [31, 136]. Плазмидные AmpC плазмидах обеспечивает резистентность к цефалоспорином, пенициллинам, монобактамам, не влияя на карбапенемы [31, 146]. Одним из механизмов устойчивости бактерии *K. pneumoniae* является чрезмерная экспрессия гена RamA, являющегося благоприятным регулятором оттока AcrAB. Данная система обеспечивает устойчивость ко многим антибиотикам

(хлорамфениколу, тетрациклином и др.), а высокая резистентность к тигециклину связана с элементом IS [31, 111, 139].

S. maltophilia обладает как видоспецифической невосприимчивостью, так и приобретенной устойчивостью ко многим антибиотикам: β -лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, макролидам, триметоприм-сульфаметоксазолу (TMP-SMX), тетрациклином, левомицетину, полимиксину и различным биоцидным веществам. Важную роль в лекарственной устойчивости *S. maltophilia* играют системы SmeABC и SmeDEF, фактором приобретенной резистентности к хинолонам. Помимо того описываются случаи мутаций генов топоизомеразы и гиразы бактерий [69, 81, 100, 176, 185, 187]. Ген AAC(6')-Iak, отвечает за снижение чувствительности к неомицину, арбекацину, нетилмицину, сизомицину, дибекацину, и тобрамицину, но не гентамицину [31, 130, 141, 171]. У *S. maltophilia* обнаружены гены устойчивости к эритромицину, изначально принадлежащие *S. aureus* [31, 63].

1.2.2. Пути преодоления антибиотикорезистентности

Распространение устойчивых штаммов микроорганизмов при дефиците или полном отсутствии антимикробных веществ для адекватной антибиотикотерапии грамотрицательных инфекций, направляют исследования на изыскание новых биологически активных соединений и разработку эффективных схем лечения инфекционных нозологий. Создание новых классов антибиотиков, которые способны преодолеть устойчивость микроорганизмов, основано на современных подходах методами геномики. Для того, чтобы преодолеть подобную устойчивость, требуется изучение иммунных механизмов взаимоотношений между микроорганизмом и хозяином. Необходим поиск мишеней действия антибиотиков в бактериальной клетке, физических и динамических характеристик препаратов в отношении грамотрицательных бактерий [31, 140].

Antimicrobial peptides – AMP. AMP – это биологически активные вещества, производимые живыми организмами от одноклеточных до животных. Антимикробные пептиды имеют высокую вариабельность состава, структуры, в большинстве своем представлены короткими полипептидами амфифильной природы. Обладая противомикробной активностью, они являются компонентами врожденной иммунной защиты (Host defense peptides – HDPS), участвуют в регенеративных процессах и поддержании гомеостаза кожных покровов. Антимикробные пептиды связываются с анионными участками липополисахарида клеточной стенки бактерий, ослабляя межмолекулярные взаимодействия, и формируют поры, тем самым повышая проницаемость стенки. По механизму действия данной группе веществ аналогичны хелатирующие агенты, дезинтегрирующие внешнюю мембрану за счет элиминирования Mg^{2+} и Ca^{2+} : ЭДТА, нитрилтриуксусная кислота, гексаметафосфат натрия, [28, 130, 151, 174].

Разнообразную группу вторичных метаболитов растений составляют фенольные соединения, которые в больших количествах содержатся в растительных клетках и играющие большую роль в адаптации растений к окружающей среде, в защите от патогенов и, в конечном счете, в эволюции [10, 46, 125]. Фенольные соединения играют большое значение также в питании человека, т.к. их суточная потребность в десятки раз выше потребности в витаминах С и Е [46, 163]. Интерес к ним возрос еще в связи с тем, что они оказывают антиоксидантное действие, снижая содержание свободных радикалов, накапливающихся в организме при воспалительных процессах, тем самым способствуя антимикробному, противовоспалительному и противоопухолевому действию [46, 137]. Немаловажную роль играют фенольные соединения как мутагены и прооксиданты, тем самым оказывая цитотоксическое действие [93].

Молекулярная структура всех фенольных соединений характеризуется наличием от одного до нескольких бензольных колец, а также одной или

нескольких гидроксильных групп. Функциональное же разнообразие этих соединений обусловлено наличием разнообразных заместителей. В описанных 8000 биогенных фенольных соединениях имеются гликозидные группы с моно-, ди- и трисахаридами, но имеются и агликоны без углеводных групп, а также полимеры [46, 107].

От числа бензольных колец и различных заместителей фенольные соединения подразделяются на фенольные кислоты, флавоноиды, антоцианидины, флавонолы; стильбены; полимерные соединения. К фенольным кислотам относятся гидроксibenзойные и гидроксикоричные, а к флавоноидам флавонолы, флавоны, изофлавоны, флавононы [46, 183]. Наиболее распространенной в природе группой являются флавоноиды, которых, по предварительным подсчетам, идентифицировано около 5000 соединений.

Проксидантные и токсические свойства флавоноидов. В процессе большого количества исследований действия флавоноидов было установлено, что эти вещества, вместе с антиоксидантной, способны проявлять прооксидантную активность. При анализе ряда публикаций обнаружено, что степень выраженности цитотоксического эффекта флавоноидов коррелирует с их способностью генерировать активные формы кислорода. Было определено, что ведущие к апоптозу увеличение активности каспаз и образование разрывов в молекуле ДНК сопровождают цитостатическое действие флавоноидов [126].

Флавоноиды способны вызывать апоптоз и у раковых клеток, ингибируя активность тиоредоксинредуктазы и супероксиддисмутазы [132, 165]. Кроме того была продемонстрирована способность флавоноидов генерировать культуральной среде H_2O_2 , при физиологических значениях pH и температуры [62, 138].

Окисление флавоноидов пероксидазой может происходить самопроизвольно или под влиянием оксидантов. Так, Galati и соавторы

наблюдали образование прооксидантных феноксильных радикалов при окислении полифенолов пероксидазой. Полученные вещества оказались способны генерировать активные формы кислорода при окислении глутатиона или NADH [98].

Продукты окисления флавоноидов, взаимодействуя с глутатионом, образовывали тиольный радикал, способный реагировать с глутатионом с, образуя дисульфидный радикал-анион, способный очень быстро восстановить до супероксидного радикала молекулярный кислород [154]. Прооксидантная цитотоксичность флавоноидов за счет образования АФК так же может быть индуцирована воздействием переходных металлов или за счет аутоокисления, величиной восстановительного потенциала пары феноксильный радикал / фенол [161]. Гидрофобная природа флавоноидов в значительной мере определяет их прооксидантные свойства и цитотоксичность [124].

Установлено, что концентрации тестируемого вещества для каждого конкретного вида клеток определяет тип воздействия флавоноидов на клетки (защита или токсичность) [46].

Следует отметить, что, благодаря прооксидантной активности, флавоноиды, в определенных условиях, активируя внутриклеточные антиоксидантные системы, косвенно способны оказывать антиоксидантное действие *in vivo*. Известно, что низкие дозы оксидантов увеличивают активность системы антиоксидантной защиты, тем самым повышая устойчивость клеток к воздействию летальных доз оксидантов в последствие (перекись водорода и супероксид) [41].

Доказано, что степень выраженности прооксидантного потенциала флавоноидов коррелирует с их способностью увеличивают активность системы антиоксидантной защиты эукариот [129].

1.3. Сельскохозяйственные культуры – источник биологически активных метаболитов.

1.3.1. Вторичные метаболиты высших растений, биологическая роль.

Вторичные метаболиты растений производятся ограниченным числом таксономических групп и представляют собой низкомолекулярные соединения, часто относящиеся к одной и той же химической группе. Общее количество известных на сегодняшний день метаболитов составляет около 70-80 тысяч [47, 48]. Считается, что это лишь малая часть из существующих в природе вторичных соединений.

Некоторые из них являются специфическими ингибиторами ферментов, другие обладают противомикробными свойствами, а также ростовой активностью [48, 60]. М. Лукнер относит их к веществам, способствующим процессам дифференциации клеток и тканей, но не играющим сколько заметной роли для самой синтезирующей их клетке [48, 60].

Наиболее известные биологически активные метаболиты такие, как регуляторы роста, фитоалексины, антибиотики, растительные токсины такие, как алкалоиды и гликозиды, принимают участие в механизмах взаимоотношения растений и микроорганизмов, определяя их устойчивость и адаптационные реакции. Они осуществляют внутривидовые и межвидовые взаимоотношения, участвуя в сохранении видов [44, 48]. К таким веществам, непосредственно принимающих участие в аллелохимических взаимодействиях, относятся фенолы, сапонины и алкалоиды [48, 142, 180, 186, 188].

Но самое большое внимание уделяется вторичным веществам растений, обладающим антибактериальными свойствами. Антибактериальные вещества (антибиотики) в растениеводстве применяются в качестве средств борьбы с патогенами и профилактике грибковых и бактериальных заболеваний [86, 143]. Это связано с их легкостью проникновения в органы и ткани растений и широким спектром действия.

Вместе с тем, действие антибактериальных веществ не зависит от погодных условий, они применяются в малых дозах, не токсичных для растений и человека, медленно инактивируются, т.е. обладают пролонгированным действием [46, 53]. Антибиотики удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к биологическим средствам борьбы с патогенами, вытесняя опасные для здоровья фунгициды и другие пестициды, все еще широко применяемыми в сельскохозяйственном производстве.

Вещества вторичного происхождения могут служить сырьем для получения препаратов широкого спектра действия и обладающих инсектицидными, фунгицидными, ростостимулирующими, стрессозащитными и другими свойствами [8, 48, 162, 164, 46, 70, 97, 169].

1.3.2. Гречиха посевная *Fagopyrum Mill* – источник флавоноидов.

Культура относится к лекарственным растениям, содержащим незаменимые полезные для человека вещества. Она является ценным сырьем для получения витамина Р (рутина) –укрепляющего стенки кровяных сосудов и выводящего из организма радионуклиды, снижающего уровень холестерина, обладает высокой антиоксидантной активностью, способствуя выведению активных радикалов, применяется для лечения многих хронических заболеваний, включая патологии эндокринной и сердечнососудистой систем. Гречиха обладает комплексом биологически активных веществ и прежде всего биофлавоноидов, которые делают ее уникальным растением, практически не подвластным многим патогенным организмам [3, 7, 11, 12, 21, 23, 25].

1.3.3. Гордецин ячменя

По мнению ряда ученых ячмень способен синтезировать антибактериальные вещества. Изучая производные шикимовой кислоты Барц, Хёлз (1975) и Эванс, Планк (1978) обнаружили в ячмене продукты деградации производных коричной кислоты: бензохинон и гидрохинон – его

дигидропроизводное. Исследователи дали им предварительное название фитоалексины ячменя [20, 51].

Антибактериальные свойства ячменя вызывали большой интерес у ленинградских ученых Новотельного Н.В. и Ежова И.С., которыми выделено физиологически активное вещество, обладающее способностью подавлять некоторые бактерии. Как выяснилось позже, данное вещество представляет собой гордецин. [36]. Гордецин обнаружен авторами и в воде, оставшейся после замачивания ячменя на пивоваренном заводе. Антибактериальная фракция, выделенная путем экстрагирования органическими растворителями, обладает широким антибактериальным и противогрибковым действием [43].

Согласно первоисточникам, гордецин относится к непредельным азотсодержащим веществам кислотной природы. Гордецин хорошо растворяется в различных спиртах, диэтиловом эфире, хлороформе, ацетоне, растительном масле, плохо или не растворим в ацетоуксусном и петролейном эфирах, бензоле. В воде, образует стабильные эмульсии. Спиртовые растворы гордецина флуоресценцию в ультрафиолетовом свете голубым цветом. При хранении в течение 6 месяцев и более очищенный препарат теряет до 50% антибактериальной активности [37, 38].

Исследованиями Ежова и Новотельнова установлена эмпирическая формула гордецина – $C_{25}H_{39}O_7N$ с молекулярной массой 465,33 и элементарным составом на 64,81% состоящего из углерода, 8,5% из водорода, 23,51% из кислорода и на 3,18% из азота [43]. Выявлена кислая природа вещества. Предположительно действующим антибактериальным началом служит непредельная нитрокетонокарбоновая кислота. Она состоит из значительного числа - CH_2 групп и активных функциональных групп: $=CO$, - $COOH$, - OH , $=CH_2$, - NO_2 . Кислота представляет собой прямую цепь, содержащую непредельные связи. Исследователи полагают, что антимикробное действие обусловлено образованием кемитидной связи

между кетонной группой гордецина и ϵ -аминогруппой лизина микроорганизма [16, 17].

У гордецина широкий антибактериальный и микоцидный спектр действия, он малотоксичен. Его применение эффективно при лечении дерматофитов, вызывающих грибковые заболевания, например при лечении кандидамикозов, эпидермофитии стоп, микробной экземы, рубофитии кожи и др. [6, 43].

Гордецин способен останавливать рост спорозоных бактерий, в связи с чем его применяют, например, для увеличения срока хранения яиц и пшеничного хлеба. Установлена способность гордецина активизировать рост дрожжей.

Карбонатная фракция, из которой был выделен гордецин, содержит также большое количество фенольных соединений, которым отводят более значимую роль в борьбе с возбудителями болезней пшеничного хлеба. Именно они могут ускорить рост грибов, способствуя дрожжевому производству, существенно снизив контаминацию бактериальной микрофлорой за счет бактериостатического действия карбонатной фракции, [57].

Еще одно биологическое действие гордецина проявляется в его способности влиять на активность амилазы гриба *Aspergillus oryzae*. В малых концентрациях антибиотик стимулирует амилазу гриба, а в больших дозах ингибирует его рост и развитие [38].

На основании данных, полученных Костромичевой Е.В., можно выделить сорта озимого и ярового ячменя с максимальным количеством действующего вещества, обладающего как бактерицидной, так и бактериостатической активностью. Полученные данные позволяют рекомендовать к использованию в качестве сырья для получения гордецина озимый сорт Жигули и яровые сорта Атаман и Нудум-1. В пределах Орловской области наиболее актуальными заболеваниями ячменя являются

мучнистая роса, ржавчина, гельминтоспориоз. Исследования показали, что устойчивость ячменя к болезням часто, но не всегда, связана с содержанием гордецина. Установлена обратная корреляция между содержанием гордецина в таких сортах ячменя как Жигули и Садко и устойчивостью мучнистой росе, гельминтоспориозу и ржавчиной [24]. С увеличением содержания гордецина происходит снижение зараженности мучнистой росой в яровых сортообразцах. При зараженности гельминтоспориозом в других сортообразцах наблюдается снижение содержания гордецина [16].

Результаты эксперимента Костромичевой Е.В. подтвердили, что гордецин имеет бактерицидную активность против патогенной микрофлоры. Более выраженным антимикробным действием обладает карбонатная фракция, что соответствует данным Ежова [17, 24].

1.3.4. Авенацин овса

По данным ряда публикаций, в периферической части зерна ряда злаковых культур (овса, ржи, пшеницы) содержатся водорастворимые антибиотические вещества, защищающие его от микроорганизмов. В 1963 году Майзелем (Maizel) и Буркхардом (Burkhardt) из корней овса было выделено и изучено антибиотическое вещество, в последствие названное авенацином. Он ответственен за устойчивость овса к грибу *Ophiobolus graminis*, вызывающего корневую гниль пшеницы и ячменя [48].

Исходя из материалов исследований этих ученых установлено, что молекула авенацина имеет в своем составе пять частей: N-метилантраниловой кислоты, пятициклического терпена, принадлежащего к классу Δ^18 -олеаненов, двух молекул глюкозы и одного неидентифицированного углевода.

Авенацин токсичен для животных при парентеральном введении, вызывает гемолиз эритроцитов, в отличие от перорального приема [84].

Авенацин корней овса представляет собой комплекс тритерпеновых гликозидов – авенацин (А-1, А-2, В-1, В-2), главным из которых является авенацин А-1 [71, 85, 90].

Его молекула состоит из углеводной части и так называемого сапогенина – агликона. В тритерпеновых гликозидах овса агликоном, который определяет их биологическую активность, является олеаноловая кислота. Авенацин является барьером на пути проникновения патогена в организм растений, обладает антимикробной и противогрибковой активностью и, взаимодействует и лизирует патогенные грибы (посредством воздействия на стерины плазматических мембран). Авенацин А-1 обладает крайне редким среди сапонинов свойством, способен к флуоресценции в УФ-свете, что позволяет установить наличие авенацина в корнях овса. Значение сапонинов велико. Постоянно открываются новые пути и возможности использования их в качестве природных пестицидов. [72, 105].

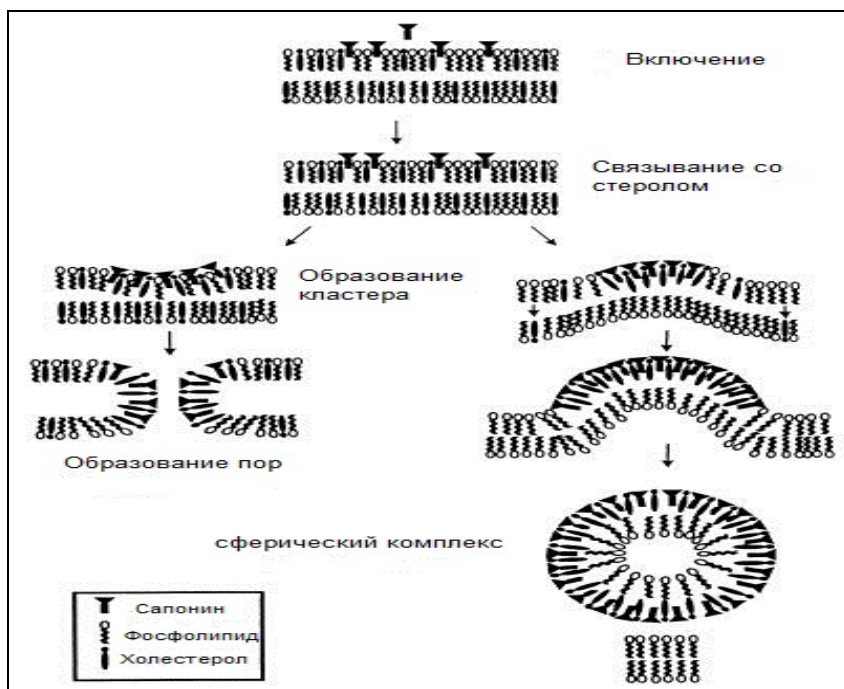


Рисунок 1. – Схема взаимодействия сапонинов со стеринами плазматических мембран грибных патогенов

1.3.5. Механизм устойчивости растений к возбудителям заболеваний.

Растения противостоят действию патогенов, либо вырабатывая вещества, способные оказать противомикробное действие, либо дефицитом веществ, необходимых для их развития. Недостаток веществ, с помощью которых растение противостоит инфекции, можно восполнить путем применения аналогов природным соединениям [19, 48, 145, 172].

Реакции, которые выработали растения в процессе эволюции, в результате которых они могут оставаться устойчивыми к воздействию патогенов, связаны со структурными, морфологическим и анатомическими приспособлениями. Те механизмы, которые работают в растениях изначально, носят название конститутивные барьеры. Это наличие кутикулы, образование папилл, индуцирование структур клеточной стенки: полисахаров, лигнина, образующих преграду для проникновения патогена у многих видов растений. Вместе с тем, они синтезируют ряд метаболитов, которые носят название элиситоров и которые вырабатываются в момент атаки чужеродным организмом. Такие реакции, связанные с синтезом веществ в ответ на действие патогенов, носят название индуцибельных реакций. К элиситорам относят белки, углеводы, алкалоиды и прочие метаболиты [38, 49, 189], а также активные формы кислорода, салициловую кислоту (СК), жасмонаты (ЖК) и этилен. Активные формы кислорода играют роль в индукции гиперчувствительности. Так, салициловая кислота вовлекается в защитную реакцию совместно с другими ингибиторами [55].

У модельного объекта арабидопсиса при изучении взаимодействия растение—микроорганизм отмечено, что происходит своеобразный феномен «перекрывания» на генетическом уровне химических компонентов, связанных с расоспецифичной устойчивостью [55, 96, 101, 177].

Одни элиситоры могут быть специфическими на конкретный паразит, но другие носят общий характер. Другие вырабатываются в ответ на внедрение патогенов, их называют индуцибельными. Таковыми являются фитоалексины и R – белки. Методы молекулярной биологии позволили

идентифицировать гены, отвечающие за устойчивость в результате синтеза определенных метаболитов, играющих роль в противостоянии патогенам. Химические вещества патогенов, направленные на растение-хозяина, легко распознаются растением и служат для них импульсом синтеза соответствующих метаболитов. Прежде всего, это индукция структурных изменений в клеточной стенке [33, 189].

Наглядно образование у устойчивых форм растений локальных некрозов, за счет которых часть ткани растения отмирает, вырезая тем самым очаг инфекции. Такая реакция растения называется реакцией гиперчувствительности ГО и запускается патогеном, но не сапрофитом, и длится короткое время, ограниченное несколькими часами [160]. Например, с помощью антисмысловой РНК можно манипулировать устойчивостью, включая индукцию запрограммированной смерти (апоптоза). [5].

Следует отметить особую роль в устойчивости таких растений как зерновые, зернобобовые, технические, овощные антиоксидантной системы, включающей высокомолекулярные соединения: ферменты пероксидазу, супероксиддисмутазу, каталазу, аскорбатокисдазу, глутатионредуктазу, и низкомолекулярные: витамины А, С, Е, а также лигнина [2012]).

Вместе с тем, растения выработали класс разнообразных по химической структуре антимикробных веществ – фитоалексинов и фитоантисипинов, играющих роль в противодействии паразитам [5, 106, 133, 189].

Антимикробные вещества фитоантисипины, к которым относятся алкалоиды, стильбены, цианогенные гликозиды и др. находятся в клетках растений изначально, независимо от инфекции. Фитоалексины синтезируются в ответ на любой стресс-фактор, включая биотический. К фитоалексинам относятся разнообразные фенилпропаноиды, алкалоиды, терпены. Эти две группы соединений могут быть у разных растений взаимозаменяемыми.

При оценке степени устойчивости к заболеваниям, например, аскохитозу или фузариозу, можно отбирать образцы растений с повышенным синтезом фитоалексинов [33, 55,189].

Чесноков Ю.В. констатирует, что для защиты от патогенов у растения синтезируются различные химические субстанции (салициловая кислота, активные формы кислорода, жасмонаты, этилен) вовлекаемые в индукцию гиперчувствительного отклика (ГО) [55, 189].

1.3.6. Грибы рода *Trichoderma* – источник биологически активных соединений

Известно, что грибы являются источником множества антимикробных соединений. Кувариной А. Е., (2016) приводится таблица основных антимикробных пептидов грибов, их продуцентов и мишеней (таблица 1) [28].

Таблица 1 – Основные АМП грибов, их продуценты и мишени по Кувариной А. Е., 2016 [28]:

<i>Пептиды</i>	<i>Источник</i>	<i>Структура</i>	<i>Способ действия</i>	<i>Организм-мишень</i>
Акулеацин	<i>Aspergillus aculeatus</i> Iizuka 1953	Липопетид	Синтез глюкогена	<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout 1923
Ауреобазидин	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary and Löwenthal) G. Arnaud 1918	Циклический депсипептид	Делокализация сборки актина	<i>Cryptococcus neoformans</i> (San Felice) Vuill. 1901
Эхинокандин В	<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter 1884	Липопептид	Синтез глюкогена	<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout 1923
Хелиоферин	<i>Mycogone rosea</i> Link 1809	Липопептид	Неизвестен	<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout 1923
Лейциностатин	<i>Penicillium lilacinum</i> Thom 1910	Аминолипопептид	Неизвестен	<i>Cryptococcus neoformans</i> (San Felice) Vuill. 1901
Мулунокандин	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier and Sartory) Thom	Липопептид	Синтез глюкогена	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. 1867
Никкомицин Х	<i>Streptomyces tendae</i>	Пептидил	Синтез	<i>Coccidioides</i>

		нуклеозид	хитина	<i>immitis</i> G.W. Stiles 1896
Полиоксин D	<i>Streptomyces cacaoi</i>	Тринуклеозид пептид	Синтез хитина	<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout 1923
Пневмокандин	<i>Zalerion arboricola</i> Buczacki 1972	Липопептид	Синтез глюкоана	<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout 1923
Трихополин	<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai 1969	Аминолипо-пептид	Неизвестен	<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout 1923

Одним из широко используемых в растениеводстве и животноводстве грибов является оппортунистический гриб *Trichoderma*. Грибы рода *Trichoderma*, выделенные из почвы, впервые были описаны в 1794 году (Persoon) как микроорганизмы, активно разлагающие органическое вещество. В настоящее время они имеют важное хозяйственное значение в связи с широким использованием многих видов для получения ферментов, биологически активных веществ и препаратов для защиты растений [109, 110, 178].

Грибы рода *Trichoderma* широко распространены в природе и играют ключевую роль в сообществе микроорганизмов [2, 108].

Микромицет обладает высокой скоростью роста, неприхотлив и легко культивируется как в лабораторных условиях, так и на производстве. Имея высокий антагонистический потенциал, он широко используется для создания и разработки антибиотических препаратов по всему миру. *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, которые способны подавлять более 60 видов фитопатогенов (*Fusarium*, *Phoma*, *Botrytis* и др.) на овощных, цветочно-декоративных, зерновых и зернобобовых культурах), имеют наибольшее биологическое и коммерческое значение. Микроорганизм безвреден для теплокровных животных, полезной энтофауны и пчел, не вызывает ожогов у растений [22, 45, 64, 65].

Исходя из данных генетика и молекулярной экологии рода установлено присутствие микромицетов в почве, где они могут быть либо сапрофитами,

либо устанавливать различные уровни взаимодействия с животными и растениями (биотрофия), кроме того, они могут быть связаны с общей микотрофией, включающую некоторые формами сочетанного микопаразитизма с условно-патогенной микрофлорой [94].

В сельском хозяйстве практикуется использование определенных разновидностей этих грибов для борьбы с различными фитопатогенами культур как открытого, так и закрытого грунта. Действующим началом препаратов на основании гриба-антагониста являются его споры, мицелий и продукты метаболизма [66, 68].

Документально подтверждено, что *T. harzianum*, как и *T. asperellum* способны индуцировать системную устойчивость против патогенов, будучи условно-патогенными симбионтами растений, ризосферно компетентны, [110].

В последние годы штаммы *Trichoderma* spp. идентифицируются как эндофитные симбионты растений. Правильно выбранные штаммы, колонизируя корни, устанавливают взаимодействие с растением на химическом уровне, что приводит к генерализованному изменению экспрессии генов растений. *Trichoderma* образовав колонии в корневой системе растения стимулирует ее рост и укрепление в целом. Не маловажным является факт защиты растения-хозяина от токсичных химических веществ, к которых гриб имеет природную устойчивость [82, 83].

Trichoderma spp. обладают признаками антибиоза и гиперпаразитизма и являются условными симбионтами растений. Вторичные метаболиты, продуцируемые этим родом грибов (от ферментов до антибиотиков) определяют их место в экологии и сельском хозяйстве. *Trichoderma* spp. синтезируют свыше 180 метаболитов, включающие различные классы химических соединений, в том числе и биологически-активные вещества, представляющие интерес для фармакологической промышленности [152, 173].

Среди метаболитов *Trichoderma* spp. выявлены соединения, которые обладают высокой биологической активностью [2]. Среди них : ауксины, цитокины и этилен [74, 75]; цитокинин- подобные молекулы, например, зеатин и гибберилин [76]; органические кислоты (глюконовая, фумаровая, лимонная) [74, 102]; аминокислоты [167]; витамины: тиамин, биотин и другие; антибиотики [110], среди которых виридин, глиовирин; ряд пептаиболов, а также стероиды, сесквитерпены и многие другие. Например, алкилпирон 6-пентил-пирон, придает запах кокоса культуре *T. viride* [153, 167].

В последнее время стало развиваться направление исследований, связанное с изучением пептаиболов. Пептаиболы – это класс антибиотиков полипептидной структуры, содержащей непротеиногенные аминокислоты. Для них характерно наличие N-ацетилированных концов и C-концов аминокислот. Пептаиболы обладают сильной активностью против ряда грибов и грамположительных бактерий (Трихотоцин А и В). Их антимикробная активность связана с способностью повреждать мембраны, приводящей к нарушению осмоса и гибели клетки. [92].

В наиболее приоритетные направления биотехнологии включено создание полноценной экологически чистой сельскохозяйственной растительной продукции, новых агротехнологических производств, биопрепаратов для животноводства [94].

Между тем, мало изученным остается механизм действия веществ с биологической активностью, особенно связанного с терапевтическими свойствами. Так например, способностью активировать иммунную систему обладают полисахарид-белковые комплексы и др. биологически активные соединения. Многие метаболиты грибов рассматривают как индукторы, способные вызывать экспрессию генов некоторых цитокининов, антиоксидантных ферментов, перехватывающих свободные радикалы, тем самым защищая клетки от окисления. Расчеты показывают, что многие

метаболиты, полученные из триходермы, обладающие лечебными свойствами и являющиеся коммерчески значимыми, в частности антиканцерогенные и иммуномодулирующие, имеют относительно более низкую стоимость, чем их синтетические аналоги [52]. Потенциальная сфера использования *Trichoderma spp.* – промышленное производство ферментов, антибиотиков и других ценных метаболитов [144].

В результате принятого Европейским союзом в 2006 г запрета на использование антибиотиков в кормовых целях, определилась высокая потребность разработке новых технологий производства кормов и кормовых добавок, обеспечивающих получение безвредной и коммерчески выгодной продукции животноводства, актуально использование не токсического кормового сырья и применение обогащенных компонентов повышающих эко-безопасность комбикормов. Не редко технические (неочищенные) антибиотики, а так же некоторые отходы их производства, например маточные растворы, включающие биомассу продуцента в культуральной жидкости, используют в качестве кормового белка (содержат до 30% белковых веществ) для животноводства и птицеводства, не смотря на следовые количества антибиотиков. Сухая биомасса мицелия продуцента с большим успехом используются в качестве добавки к кормам. Они прекрасно поедаются животными и птицами, так как, по-видимому, они обладают хорошим вкусом, а по запаху напоминают сушеные грибы. На данный момент в Российской литературе не представлены результаты исследований по применению в зоотехнии и ветеринарной медицине грибов *Trichoderma spp.* Однако по совокупности имеющейся на сегодняшний день информации есть возможность сделать предположение, что кормление животных препаратами на основе микромицета, а так же использование в лечебно-профилактических мероприятиях могут быть актуальны. Биотехнологическое получение биопродукции на основе мицелиальных грибов является инновационным. Известно, что мицелиарные грибы, характеризующиеся

апикальным ростом демонстрируют рекордные показатели прироста биомассы (за минуту гифа удлиняет свой конец в пределах 100 мкм). Для биотехнологических производств такая способность мицелиальных грибов чрезвычайно важна. Так, из штамма *T. atrobrunneum* выделены антибиотические соединения, показывающие их микробиологическую активность на патогенных, условно-патогенных и фитопатогенных микроорганизмах [156].

В последнее время российская микробиологическая промышленность находится на грани развала, большое количество биопрепаратов поступают в Россию импортом из-за рубежа. Подобная ситуация способна привести к абсолютной зависимости отечественной ветеринарии от иноземного рынка, что так же станет причиной невозможности своевременного принятия мер по борьбе с зоонозными инфекциями в масштабах страны. Эти обстоятельства чреваты пагубными экономическими и социальными последствиями, а ослабление профилактических мер может привести вспышкам инфекций, массовым заболеваниям среди животных и людей, падежу скота и птицы и, к массовым отравлениям населения продуктами питания. В свете принятых программных мероприятий по обеспечению ветеринарного благополучия страны по опасным инфекционным заболеваниям сельскохозяйственных животных, актуальной задачей и одной из жизненно важных проблем в социально-экономической политике государства является разработка концепции производства биологических препаратов [27].

1.3.7. Биологический контроль в сельскохозяйственном производстве

В мире значительная часть полученного урожая сельскохозяйственных культур гибнет от различных болезней и вредителей. Подсчеты показывают, что в зависимости от условий года, потери могут составлять от 30 до 70%. Химические средства борьбы еще не привели к значительным успехам в растениеводстве, однако негативно повлияли на общую экологическую

составляющую. Все научное сообщество озабочено загрязнением окружающей среды пестицидами и разрабатывает альтернативные, мягкие способы борьбы с биотическими факторами. На помощь приходит биотехнология. Уже многие годы производится биотехнологический картофель, который получают *in vitro* из меристем, свободных от вирусных инфекций [189].

Благодаря биотехнологии разработаны биологические препараты, в основе которых лежат живые микроорганизмы, в частности созданы промышленные инсектицидные вирусы для культивирования в животных клетках. В ВИЗРе на протяжении более 50 лет разрабатываются биопрепараты на основе бактерий и грибов для сельского хозяйства. Именно в этом институте создан первый препарат на основе *T. Viride (Pers.) Fr.* Препараты безопасны для животных и человека и успешно используются как эффективное средство для биологического контроля вредных организмов [59].

Наличие большого количества уже изученных биологически активных веществ, выделяемых грибами рода *Trichoderma*, а также огромного количества метаболитов еще не идентифицированных и не изученных. Успешный опыт многолетнего биоконтроля патогенных микроорганизмов-возбудителей болезней растений с использованием грибов *Trichoderma spp.* указывает на их большие перспективы в сельском хозяйстве имеет [13].

Анализ литературных источников позволил оценить состояние исследований в области механизмов резистентности болезнетворных организмов и обосновать необходимость поиска новых компонентов биологически активных веществ из растений и грибов для создания биологических средств защиты сельскохозяйственных растений и вакцин для животных и сформулировать цели и задачи данной работы. Обоснована актуальность, новизна и практическая значимость исследований.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Исследование проводилось в условиях ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии», «Инновационном научно-исследовательском испытательном центре коллективного пользования» ФГБОУ ВПО «Орловский ГАУ» и ФКП «Орловская биофабрика» в период с 2013 по 2018 г.

2.1. Объекты исследования. В работе использовали: дигидрокверцетин; биофлавоноиды, рутин и препарат под торговой маркой «РутиФлав» (приложение 5) из гречихи сорта «Дикуль», созданную в ФГБНУ «ВНИИ зернобобовых и крупяных культур», Орловская область, включенный в Госреестр селекционных достижений с 1999 года (предоставлены к.т.н., Гнеушевой И.А.); гордецин из ячменя из сорта «Атаман», включенный в Госреестр с 2006 года по Центральному и Центрально-Черноземному регионам РФ (предоставлен к.б.н. Костромичевой Е.В.); авенацин из овса сорта «Кречет», Кировская область (предоставлен к.б.н. Солохиной И.Ю.); метаболиты грибов *Trichoderma* spp. (*T. atrobrunneum*, *T. lignorum*, *T. lixii* Pat, *T. viride*), предоставленные сотрудниками МГУ, а также изоляты из почв Орловской области. Контрольные культуры *E. coli* ATCC 25922 и *K. pneumoniae* ATCC 13883; клинические штаммы *E. coli* 11/1, *K. pneumoniae* 24/4. Субстанции антибиотиков: амоксициллина тригидрат, меропенена тригидрат. цефазолина натриевая соль, ципрофлоксацина гидрохлорид.

2.2. Материальная часть.

2.2.1. Реактивы и расходные материалы.

Среда ГМФ-агар, Среда ГМФ-бульон, Набор для окраски по Граму, Пробка ватно-марлевая (ОАО «НИЦФ», РФ); «ДНК-ЭКСПРЕСС», ТАЕ-буфер (НПФ Литех, РФ); о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ДиаМ, РФ); Sorbifil (ООО «ИМИД», РФ); 2-меркаптоэтанол, реактив Фолина-Чокальтеу, ТЕМЕД (Acros Organics, США); Кислота трихлоруксусная (AppliChem,

Германия); Глицин (Panreac, Испания); Кислоты лаурилсерной натриевая соль, Ксантина натриевая соль, Ксантинооксидаза, Кумасси G-250, реактив Бредфорда, Цитохром С (SIGMA-ALDRICH, Германия); Аммоний надсерноокислый (ГОСТ 20478-75); Бромфеноловый синий (ТУ 6-09-3719-83); Вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72); Глицерин (ГОСТ 6824-96); Диски из фильтровальной бумаги (ГОСТ 12026-76); Железо серноокисное (ГОСТ 4148-78); Калий фосфорнокислый однозамещенный (ГОСТ 4198-75); Калий фосфорнокислый двухзамещенный (ГОСТ 2493-75); Калий хлористый (ГОСТ 4568-95); Кислота серная (ГОСТ 4204-77); Кислота уксусная (ГОСТ 61-75); Кислота хлороводородная (ГОСТ 3118-77); Магния серноокислый гептагидрат (ГОСТ 4523-77); Марля (ГОСТ 9412-93); Меди сульфат пентагидрат (ГОСТ 4165-78); Мембраны «Владипор» типа МФА-МА (ТУ 6-05-1903-87); Метанол (ГОСТ 2222-95); Набор для окраски по Романовскому–Гимзе; Натрий азотноокислый (ГОСТ 4168-79); Натрий хлористый (ГОСТ 4233-77); Натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77); Водорода перекись (ГОСТ 177-88); Сахароза (ГОСТ 5833-75); Трис (ТУ 6-09-4292-76); Фильтр бумажный (ГОСТ 12026-76); Фильтр ватно-марлевый (ГОСТ 22379-93); Хлороформ (ТУ 2631026-78119972-2010); ЭДТА (ГОСТ 10652-83); Этанол (ГОСТ 5962-2013); Этилацетат (ГОСТ 22300-76).

2.2.2. Оборудование.

Ультразвуковой дезинтегратор Soniprep 150 (MSE, Великобритания); планшетный фотометр Multiskan EX (Thermo Electron, Германия); центрифуга с охлаждением SR 16 (Thermo Scientific, США); камера для вертикального электрофореза Mini protein (Bio-Rad, США); спектрофотометр СФ 56 (ЛОМО, Россия); ферментер Minifors (Infors, Швейцария).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Микробиологические методы

2.3.1.1. Получение мицелия *Trichoderma spp.*

Навеску почвы суспендировали в дистиллированной воды (1:9) и перемешивали 15 мин. и разводили в соотношениях 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Из проб двух последних разведений брали по капле суспензии и наносили на твердую среду Чапека, инкубировали при 24°C до образования макроспор и пересевали на свежую среду. Чистую культуру выращивали 15 дней, мицелий снимали и помещали в пробирку для длительного хранения.

2.3.1.2. Получение экстрактов биомассы микроорганизмов.

Бульонные культуры на поздней экспоненциальной фазе роста отмывали от среды трехкратным 10 минутным центрифугированием-ресуспендированием при ускорении 5000 g, при температуре +4 °С, в охлажденном до заданной температуры 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе, рН 7,0. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали тем же буфером и подвергали ультразвуковой дезинтеграции в охлаждаемой проточной кювете; центрифугировали 10 минут, с ускорением 10000g, при температуре +4 °С, супернатант отбирали для дальнейшей работы.

2.3.1.3. Определение чувствительности к антибиотическим препаратам и минимальной ингибирующей концентрации по МУК 4.2.1890-04 [35]. Для определения чувствительности микроорганизмов к опытным препаратам и их МИК применяли диско-диффузионным метод и метод серийных разведений. Диски нагружали препаратами и высушивали до полного удаления растворителей при температуре +6°C. Среду инокулировали 1 мл взвесью суточной тест-культуры, с мутностью, соответствующей 0,5 McF. Инкубировали 24 часа при 35°C, результат оценивали визуально. На основе бульонной среды готовили серийные разведения препаратов, инокулировали бактериальной взвесью, получив конечную концентрацию 5×10^5 КОЕ/мл, Инкубировали 24 часа при 35 °С с орбитальным перемешиванием 600 мин⁻¹, результат оценивали денситометрически в двухволновом режиме 450/680 нм. (+6 °С – контроль).

2.3.1.4. Биоавтография. На пластину Sorbifil (L = 50 мм) наносили исследуемый препарат и помещали в камеру с системой элюентов хлороформ:метанол (3:1). Хроматографию останавливали при заполнении элюентом всего сорбента, пластины извлекали и высушивали до полного удаления растворителей. Готовую пластину делили на полоски с заданными размерами и апплицировали каждую на газонную культуру тестируемого микроорганизма. Инкубировали 24 часа при 35 °С, результат учитывали визуально, определяли Rf активной фракции [26].

2.3.1.5. Определение осмотической резистентности. Ставили ряд опытов с варьированием концентрации NaCl от 1 до 13% с шагом 1%. В качестве питательной основы использовали стандартную рецептуру среды ГФМ-бульон. Инкубировали 24 часа при 35 °С с орбитальным перемешиванием 600 мин⁻¹, контрольный образец помещали в холодильник. Результат оценивали денситометрически в двухволновом режиме 450/680 нм с бланком по контрольному образцу. По изменению оптической плотности рассчитывали процент плазмолиза: $\% = D_x / D_k \times 100$.

2.3.1.6. Определение адгезивных свойств по Брилис (1986) [32]. Калю взвеси эритроцитов I (Rh+) и бактерий в физиологическом растворе 0,5 и 4 McF, соответственно, наносили на стекло, смешивали, инкубировали 30 минут при температуре 37°С. Готовили мазки, с комбинированной окраской по Граму и Романовскому–Гимзе. Адгезивную активность определяли, количеством бактериальных клеток, прикрепившихся к 5 эритроцитам в пяти полях зрения:

- СПА (средний показатель адгезии)
- КУЭ (коэффициент участия эритроцитов)
- ИАМ (индекс адгезивности микроорганизма:

$$\text{ИАМ} = \frac{\text{СПА}}{\text{КУЭ}} \times 100$$

Бактерия считается: неадгезивной – ИАМ $\leq 1,75$; низкоадгезивной – ИАМ 1,76-2,5; среднеадгезивной – ИАМ 2,51-4,0; высокоадгезивной – ИАМ $> 4,0$.

2.3.1.7. Формулы расчета основных кинетических характеристик роста микроорганизмов:

удельная скорость роста $\mu = \frac{dX}{dt} \times \frac{1}{X}$ (1);

максимальная удельная скорость роста $\mu_m = \frac{K_s}{\text{tg} \alpha}$ (2);

время генерации $g = \frac{\ln 2}{\mu}$ (3);

константа скорости деления $v = \frac{1}{g}$ (4);

число клеточных делений $n = v \times t$ (5);

экономический коэффициент $Y = \frac{dX}{dS}$ (6);

метаболический коэффициент $q = \frac{\mu}{Y}$ (7).

2.3.2. Биохимические методы.

2.3.2.1. Определение активности ферментов.

2.3.2.1.1. Определение активности β -галактозидазы по Craven (1965) [89]. Реакционную смесь содержащую 0,05М о-нитрофенил- β -D-галактопиранозида и 0,1М фосфата калия, соединяли с исследуемым материалом в соотношении 1:100 и инкубировали 1 минуту при комнатной температуре. Активность β -галактозидазы определяли по изменению оптической плотности при длине волны 405 нм в течение 60 секунд. ϵ_{405} о-НФГ = 3500 л \times моль $^{-1}\times$ см $^{-1}$ [117].

2.3.2.1.2. Определение протеазной активности по Anson (1938) [67]. Равные объемы биоматериала совместно инкубировали 15 минут при температуре +25 $^{\circ}$ С, добавляли четыре объема 3М раствора трихлоруксусной кислоты, встряхивали и центрифугировали 5 минут с ускорением 10000 g. Полученный супернатант отбирали и анализировали по методу Лоури [118, 131]. Для расчета активности использовали калибровочную кривую по тирозину.

2.3.2.1.3. Определение активности супероксиддисмутазы по McCord & Fridovich (1969) [134]. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимое для ингибирования реакции восстановления цитохрома С на 50%. Реакционная смесь содержала 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,8; 0,1 мМ ЭДТА; 50 мкМ ксантина натриевой соли; 1,7 мЕ ксантиноксидазу; 10 мкМ цитохром С. Соотношение «образец:рабочий реактив» = 1:30. Пробы инкубировали 30 минут, при температуре $+25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, оптическую плотность измеряли при λ 550 нм, $l = 1$ см [110].

2.3.2.1.4. Определение активности каталазы по Beers & Sizer (1952) [73]. Реакционная смесь содержала 13 мМ H_2O_2 в 0,5 М Трис/НСl-буфере, рН 8,0. Измеряли спектрофотометрически при $+25^\circ\text{C}$, при λ 240 нм, $l = 1$ см, $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. За единицу активности каталазы принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль H_2O_2 вмин⁻¹ [119].

2.3.2.2. Количественное определение субстратов.

2.3.2.2.1. Количественное определение общего содержания углеводов по Dubois et al. (1956) [95]. Общее содержание углеводов устанавливали по реакции с фенолом в присутствии серной кислоты. Реакционная смесь содержала 1 часть биоматериала, 1 часть 5% раствора фенола и 5 частей концентрированной серной кислоты. Пробы перемешивали, инкубировали 15 минут при температуре $+10^\circ\text{C}$. Измеряли оптическую плотность при 488 нм против контрольного образца. Концентрацию в пробах определяли по стандартной калибровочной кривой.

2.3.2.2.2. Количественное определение сахарозы [58]. В мерной колбе соединяли 10 частей образца и 1 часть $\text{HCl}_{\text{конц.}}$ ($\rho_{20^\circ\text{C}} = 1,188$) инкубировали 8 минут при температуре 68-70 $^\circ\text{C}$, с перемешиванием, охлаждали до 20 $^\circ\text{C}$. Реакционную смесь нейтрализовали 20% раствором NaOH, контролируя процесс по индикаторной бумаге, доводили водой до метки. В полученном растворе определяли содержание редуцирующих веществ по Вешнякову [9]. Концентрацию сахарозы рассчитывали по формуле: $C_{\text{сах}} = (C_{\text{н}} - C_0) \times 0,95$,

где: $C_{и}$ – концентрация РВ после инверсии; C_0 – концентрация РВ до инверсии; 0,95 – коэффициент пересчета инвертата в сахарозу.

2.3.2.2.3. Количественное определение общего содержания белка в биомассе по Bradford (1976) [79]. К пробам, разведенным в 100 раз, добавляли реактив Бредфорда (в соотношении 1:50, инкубировали при комнатной температуре до появления окраски. Оптическую плотность измеряли в кювете с длиной оптического пути 1 см, при $\lambda = 595\text{нм}$. Концентрацию в пробах рассчитывали по стандартной калибровочной кривой [115].

2.3.2.2.3. Количественное определение содержания пептона в питательной среде по МУК 4.2.2316-08 [34]. К 5 частям испытуемого раствора добавляют 1 часть биуретового реактива. Одновременно готовят контрольную пробу и проводят определение, как описано при построении калибровочной кривой. Концентрацию пептона в испытуемом растворе в процентах вычисляют по калибровочной кривой и производят перерасчет с учетом разведения [113, 116].

2.3.3. Молекулярно-биологические методы.

2.3.3.1. Определение резистентности к антибиотикам обнаружением специфических генов-маркеров методом ПЦР, с помощью коммерческих наборов производства НПФ Литех, Москва. Суточную культуру суспендировали в реагенте для выделения ДНК, набор «ДНК-ЭКСПРЕСС», перемешивали, инкубировали 20 минут, при температуре $+98^{\circ}\text{C}$, центрифугировали 15 секунд с частотой вращения 12000 мин^{-1} , отбирали супернатант. В пробирки с ПЦР-смесью вносили по 5 мкл супернатанта, положительного и отрицательного контрольного образца, центрифугировали 15 секунд с частотой вращения 2000 мин^{-1} . Амплифицировали по следующим программам (таблица 2):

Таблица 2 Программа для амплификации тест-систем: а – «Резистентность к цефалоспорином – 1»; б – «Резистентность к

карбапенемам– 1, 2» и «Резистентность к пенициллинам»

а

t, °C	Время, секунды	Кол-во циклов
93	пауза	35
93	30	
59	30	
72	30	
10	хранение	

б

t, °C	Время, секунды	Кол-во циклов
94	пауза	
94	90	
94	10	40
64	10	
72	40	
72	120	
10	хранение	

Амплификаты разделяли электрофорезом в 2% геле агарозы на 50×ТАЕ-буфере, окрашивали 1% бромистым этидием. Результат регистрировали на трансиллюминаторе (Биокон).

2.3.4. Электрофорез белков в редуцирующих условиях по Laemmli (1970) [128]. Электрофорез проводили по методу с некоторыми изменениями на геле размером 7×8×0,1 см. Разделяющий гель (T=12%; C=5%) содержал: 0,375M Трис-НСI рН 8,7; 10% SDS; 8 мкл ТЕМЕД; 80 мкл 10% раствора персульфата аммония. Электродный буфер содержал: 0,025 M Трис; 0,192 M глицина; 0,1% SDS – рН 8,3. Буфер для разведения образцов содержал: 3 мл 1M Трис-НСI, рН 6,8; 1 г SDS; 2,5 мл 2-меркаптоэтанола; 3 мл глицерина; 0,05 г БФС. Образец смешивали в соотношении 3:1 с БРО, кипятили 5 минут водяной бане, охлаждали до комнатной температуры. Экспонировали при температуре +10°C, V = 180 В на гель до выхода фронта красителя из геля. Гель фиксировали, окрашивали раствором Кумасси G-250, 10 минут при 65–80°C. Фоновую окраску отмывали кипячением в 5% уксусной кислоте, 15 минут.

2.3.5. Биотехнологические методы.

Приготовление инокулята продуцента. Из недельной агаровой культуры *T. atrobrunneum* готовили на физиологическом растворе суспензию с мутностью 1,5 McF. Засевали стандарт 1:10 в 100 мл жидкой среды Чапека в колбах Эрленмейера на 250 мл с ватно-марлевыми пробками, инкубировали 5 суток на качалке при температуре 28 °C.

Глубинное культивирование. Сухие компоненты питательной среды отбирали из расчета на 1 литр воды в количестве 0,2% натрия азотнокислого, 0,1% калия фосфата однозамещенного, 0,05% магния сернокислого гептагидрата, 0,05% калия хлористого, 0,001% железа сернокислого (w/v). Солевой раствор нагревали с постоянным перемешиванием до растворения осадка и пропускали через ватно-марлевый фильтр для полного удаления не растворившихся частиц. Реактор готовили к работе в соответствии с его инструкцией по эксплуатации. Питательную среду загружали в реактор и стерилизовали автоклавированием 10 минут при давлении 1 атм., охлаждали до 28°C, при помощи 20% раствором натрия едкого устанавливали pH 7,4±0,1. В среду асептически вносили стерильный концентрат сахарозы до конечной концентрации 1,5% w/v в пересчете на сухое вещество. Засев культурой *T. atrobrunneum* производили из расчета 0,5% инокулята (v/v) к объему среды в реакторе. Выращивают культуру 5 суток при температуре 28,0±0,5 °C, перемешивая с частотой 120 оборотов в минуту. В процессе работы ферментера осуществляли постоянный контроль и корректировку pH, температуры и скорости перемешивания, поддерживая значение на установленном уровне. Культивирование прекращали, при достижении lg C = 7±0,5, что денситометрически определяется как 9 McF.

Выделение антимикробных соединений. Полученную культуральную жидкость очищали от грибных тел последовательной фильтрацией через марлю и бумажный фильтр, центрифугировали 10 минут с ускорением 10000g, супернатант очищали ультрафильтрацией под вакуумом. Фильтрат культуральной жидкости соединяли с равным объемом этилацетата и перемешивали 180 минут на магнитной мешалке при комнатной температуре, в темноте. Отстаивали до разделения слоев и отбирали неполярную фракцию.

Концентрирование антимикробных соединений. Упаривали на ротационном испарителе при t 40 °C, p -1 атм. до полного удаления растворителя. Полученный остаток восстанавливают в 5 мл 60% этанола.

Оптимизация процесса культивирования. С целью оптимизации процесса культивирования *T. atrobrunneum* с максимальным выходом метаболитов, обладающих бактериостатической активностью, был реализован полный факторный эксперимент по плану 2^3 . Параметром оптимизации Y был выбран диаметр зоны подавления роста тест-культуры *E. coli*. Факторами варьирования выбрали: X_1 – посевную дозу продуцента, % v/v; X_2 – время инкубации, сутки; X_3 – концентрацию сахарозы, г/л. Значения факторов и единицы варьирования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Значения факторов и единицы варьирования.

Фактор	Уровень			Единица варьирования (λ)
	нижний (-)	средний (0)	верхний (+)	
X_1	0,5	0,75	1,0	0,25
X_2	5	7,5	10	2,5
X_3	15	22,5	30	7,5

Экспериментальные данные, проведенные в трехкратной биологической и аналитической повторностях, обрабатывались в программе Microsoft Office Excel 2010.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Бактериостатические свойства растительных и грибных метаболитов. Среди препаратов, представленных к испытаниям, определяются образцы с низкой (*T. viride* – 10,91; *T. lignorum* – 11,21; дигидрокверцетин – 8,8; рутин – 7,06; "Рутифлав" – 9,3; авенацин – 6,66; гордецин – 6,69), умеренной (*T. atrobrunneum* – 12,51; биофлавоноиды – 12,91) и высокой (*T. lixii* Pat – 21,31) антибиотической активностью (таблица 4).

Таблица 4. – 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 X _{cp} ±σ, мм								
Контроль (амфотерицин В)	6,0	6,0	6,0	22,8 ±0,7	6,0	6,0	23,6 ±0,5	22,4 ±0,8	12,35
Контроль (ципрофлоксацин)	22,3 ±0,1	21,8 ±0,6	22,7 ±0,8	6,0	23,5 ±0,7	23,1 ±0,4	6,0	6,0	16,43
Контроль (хлоргексидин)	18,2 ±0,3	19,5 ±0,5	18,4 ±0,3	16,6 ±0,7	19,3 ±0,4	20,4 ±0,9	16,7 ±0,1	17,5 ±0,2	18,33
<i>T. atrobrunneum</i>	23,6 ±0,4	22,3 ±0,8	23,8 ±0,5	6,0	6,0	6,0	6,1 ±0,1	6,3 ±0,06	12,51
<i>T. lignorum</i>	6,0	6,0	6,1 ±0,1	6,0	14,6 ±0,2	12,6 ±0,1	20,5 ±0,3	17,9 ±0,1	11,21
<i>T. lixii</i> Pat	21,2 ±0,6	19,2 ±0,7	21,5 ±0,2	6,0	25,4 ±0,5	24,9 ±0,2	26,5 ±0,6	25,8 ±0,34	21,31
<i>T. viride</i>	6,0	6,0	6,0	6,0	12,4 ±0,1	16,7 ±0,5	15,8 ±0,09	18,4 ±0,2	10,91
Биофлавоноиды	11,8 ±0,1	10,7 ±0,2	10,4 ±0,1	12,3 ±0,6	13,2 ±0,05	12,7 ±0,1	15,8 ±0,09	16,4 ±0,7	12,91
Дигидрокверцетин	8,5 ±0,1	9,9 ±0,04	7,1 ±0,4	6,2 ±0,5	9,7 ±0,1	10,1 ±0,04	6,4 ±0,4	6,7 ±0,2	8,80
Рутин	9,1 ±0,06	6,9 ±0,8	6,5 ±0,9	6,0	7,9 ±0,2	8,1 ±0,7	6,0	6,0	7,06
"Рутифлав"	9,2 ±0,02	8,8 ±0,6	8,3 ±0,1	7,1 ±0,2	10,3 ±0,02	12,5 ±0,6	9,8 ±0,1	8,4 ±0,9	9,30
Авенацин	6,7 ±0,08	7,4 ±0,04	7,1 ±0,08	6,0	6,7 ±0,08	7,4 ±0,04	6,0	6,0	6,66
Гордецин	7,2 ±0,1	6,8 ±0,06	7,5 ±0,3	6,0	7,2 ±0,1	6,8 ±0,06	6,0	6,0	6,69

Чувствительность: ≤6 – отсутствует; 6,1-12,0 – слабая; 12,1-18,0 – средняя; 18,1≤ –

В таблице 4 показано, что препарат биофлавоноидов гречихи, дигидрокверцетин, "Рутифлав", а так же метаболиты *T. lignorum*, *T. viride* обладают более высокой активностью в отношении фитопатогенной микрофлоры, в то время как рутин, авенацин, гордецин и метаболиты *T. atrobrunneum* дают заметно лучшие результаты в экспериментах с условно-патогенными бактериями. Так же стоит отметить, что гриб *A. cucumis* устойчив к растительным метаболитам ($\varnothing \leq 6,0$ см), кроме препарата биофлавоноидов гречихи и «Рутифлав» ($\varnothing 15,8$ и $9,8$ см соответственно) и чувствителен к метаболитам *T. lignorum*, *T. lixii* Pat, *T. viride* ($\varnothing 15,8 - 26,5$ мм). *C. albicans* ATCC 10231 устойчива ко всем образцам, кроме контрольных и препарата биофлавоноидов гречихи.

Особый интерес вызывает препарат метаболитов *T. lixii* Pat, подавляющий рост 87,5% выборки тест-культур с коэффициентом антибиотической активности 21,31. Образец обладает высокой антибиотической активностью в отношении как условно-патогенной микрофлоры (19,2 – 21,5 мм), так и фитопатогенов ($\varnothing 24,9 - 26,5$ мм).

Препарат метаболитов *T. atrobrunneum* проявляет максимально выраженную избирательность антибиотической активности. При коэффициенте антибиотической активности 12,51 данный образец подавляет рост условно-патогенных тест-культур с наибольшими значениями диаметров зон ингибирования 22,3 – 23,8 мм. На фитопатогены оказывает минимальное воздействие ($\varnothing 6,1-6,3$ мм).

По результатам скрининга определено, что препараты растительных метаболитов и грибов, исключая *T. atrobrunneum*, имеют большую перспективу в борьбе с инфекциями растений в качестве компонентов средств защиты.

Для препаратов, показавших выраженный бактериостатический эффект в отношении условно-патогенной микрофлоры на этапе диско-диффузионного

скрининга, методом серийных разведений определены минимальные концентрации, подавляющие рост бактерий (таблица 5).

Таблица 5 Минимальные концентрации, подавляющие рост бактерий

Препарат	$X_{cp} \pm \sigma$, мкг/мл
<i>T. atrobrunneum</i>	1,68±0,2
<i>T. lignorum</i>	15,12±1,9
<i>T. lixii</i> Pat	4,2±0,4
<i>T. viride</i>	7,87±0,9
Биофлавоноиды	6,13±0,5
Дигидрокверцетин	2,62±0,2
Рутин	9,61±0,7
"Рутифлав"	15,04±1,3
Авенацин	46,1±3,6
Гордецин	2,9±0,3

В дальнейшей работе использованы субингибирующие концентрации, рассчитанные как СубИК = МИК – 0,25 МИК. По итогам скрининга коллекции микроорганизмов найден штамм *E. coli* из клинического материала кошки, показавший наибольшую чувствительность к представленной группе препаратов.

Результаты измерений кинетики роста при совместном инкубировании с образцами препаратов показали различную степень биологического воздействия на тест-объект *E. coli*. Бактериостатическое действие выразалось удлинением lag-фазы по сравнению с интактной культурой, самое продолжительное время наблюдалось в эксперименте с образцом биофлавоноидов гречихи и составило 426 минут (приложение 1).

3.2. Влияние растительных и грибных метаболитов на МИК β-лактамовых антибиотиков.

β-лактамовые антибиотики пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы дольше всех применяются в клинической практике, поэтому проблема резистентности к ним наиболее серьезна.

Для выявления толерантности бактерий к определенному антибиотику используют показатель минимальной ингибирующей концентрации (МИК). МИК – это наименьшая концентрация антибиотиков, которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерий. Результаты МИК β-лактамных антибиотиков представлены на рисунке 4.

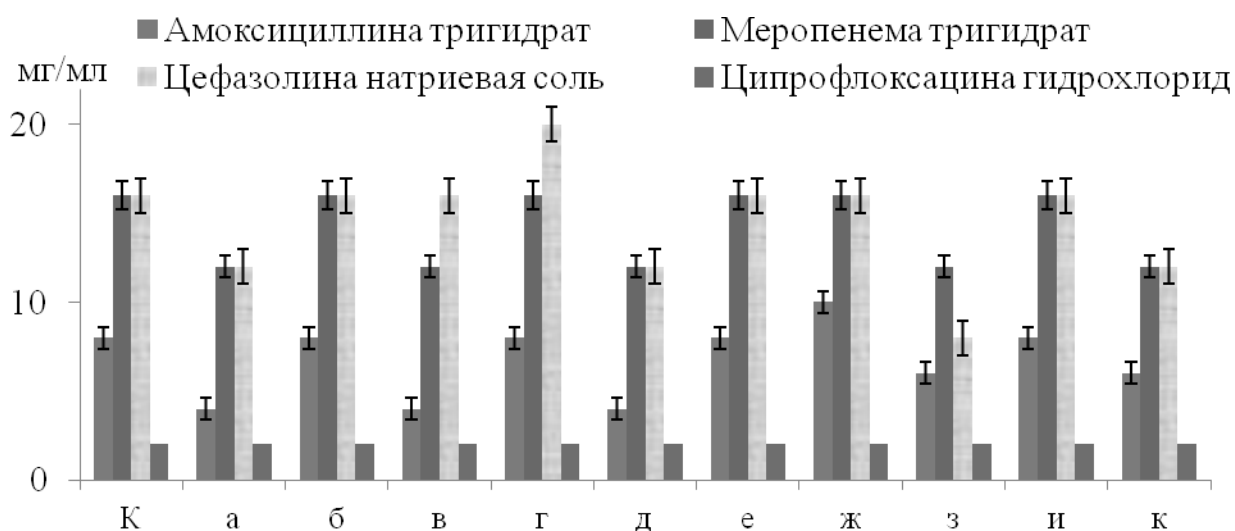


Рисунок 4. Результаты МИК β-лактамных антибиотиков при совместном инкубировании с препаратами: К – контроль, а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

В опыте использовали клинические штаммы *E. coli*, проверенный на отсутствие генов резистентности VIM, CTX-M, TEM. В результате эксперимента установлено, что при совместной инкубации с препаратами метаболитов *T. atrobrunneum*, *T. lixii* Pat, биофлавоноидов гречихи, "Рутифлав" и гордецина наблюдается ощутимое повышение эффективности β-лактамных антибиотиков за счет увеличения чувствительности тест-культуры к соответствующему веществу. По данным диаграммы очевидно, что метаболиты *T. atrobrunneum*, *T. lixii* Pat, биофлавоноиды гречихи, "Рутифлав", гордецин способны снижать МИК β-лактамных антибиотиков на 25 – 50%; *T. viride* и рутин увеличивают на 25% МИК цефазолина и амоксициллина соответственно.

3.3. Влияние растительных и грибных метаболитов на устойчивость *E. coli* к действию факторов среды.

3.3.1. Изучая термолабильность *E. coli* в процессе культивирования при варьировании температуры инкубации наблюдалось уменьшение прироста биомассы в среднем на 23,81% (приложение 2). Подобный эффект возникал в экспериментах с препаратами, показавшими как умеренный, так и низкий бактериостатический эффект в стандартных условиях. В эксперименте с образцом биофлавоноидов гречихи отмечен наименьший прирост биомассы на 35,05% ($p=0,22$) ниже интактной культуры (рисунок 5.1).

3.3.2. Препараты биофлавоноидов, гордецина и *T. atrobrunneum* F-1434 увеличивают процент угнетения роста микроорганизма уже при 2% соли. При испытании осмотической резистентности *E. coli* препарат биофлавоноидов гречихи, гордецин, метаболиты *T. atrobrunneum* и *T. lixii* Pat усиливают угнетение роста микроорганизма уже при 2% соли (приложение 3). Наибольший эффект наблюдается в эксперименте с препаратом метаболитов *T. atrobrunneum* (рисунок 5.2).

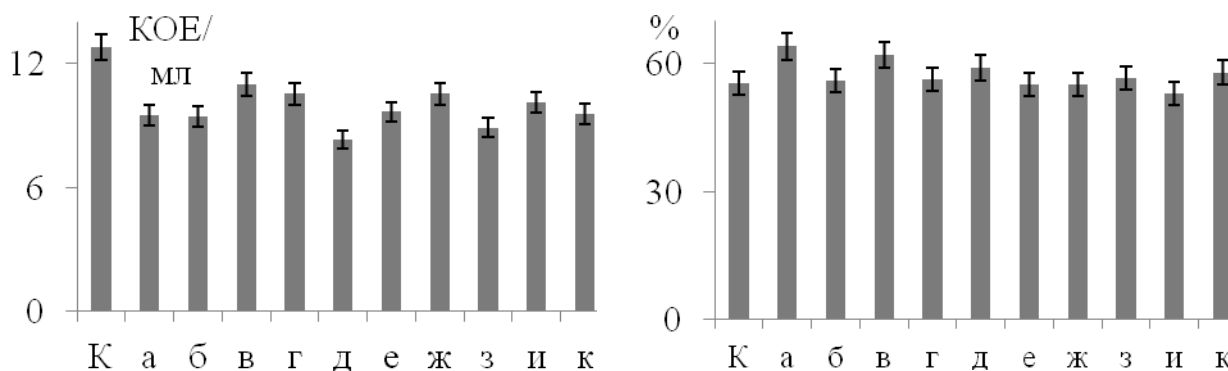


Рисунок 5 – 1 - Прирост биомассы; 2 - Показатель плазмолиза *E. coli* при совместном инкубировании с препаратами: К – контроль, а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

В среднем данный образец увеличивает плазмолиз на 31,12% ($p<0,05$). В то же время образцы дигидрокверцетин, рутин и авенацин снижают показатель плазмолиза в нижнем и среднем диапазоне концентраций NaCl на

5,5% – дигидрокверцетин, 2,87% – рутин, 10,8% – авенацин ($p < 0,05$). Модификация клеточной стенки, вызванная влиянием факторов внешней среды, неизбежно приводит к изменению ее функционального статуса. Сдвиг внутриклеточного осмотического давления, является признаком физиологической несостоятельности клеточной стенки, что сопровождается угнетением роста культуры.

3.4. Влияние растительных и грибных метаболитов на адгезивные свойства *E. coli*. В эксперименте использовали клинический штамм *E. coli*, проверенный на отсутствие генетических маркеров EAEC. На эритроцитах группы I (Rh+) тест культура показала высокую адгезивность: индекс адгезивности микроорганизма 5,35 при среднем показателе адгезивности 4,08 и коэффициенте участия эритроцитов 76,28% (рисунок 6)

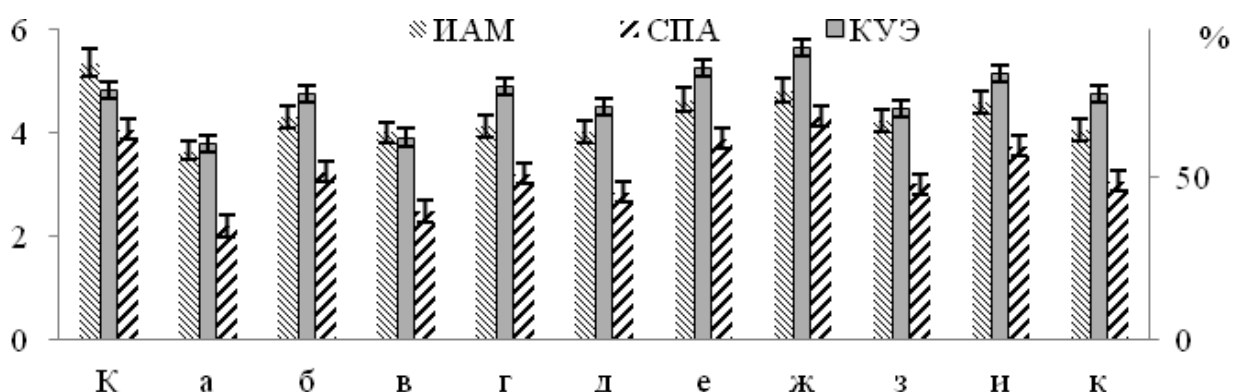


Рисунок 6 – Адгезивность *E. coli*; К – контроль, а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

В сравнении с контролем все препараты дают снижение адгезивности клеток *E. coli* в среднем на 24% до показателей ИАМ 3,45 – 4,78 при СПА 2,60 – 3,36 и КУЭ 68,72 – 86,96%. Наиболее выраженное уменьшение адгезивности вызвал препарат метаболитов *T. atrobrunneum*: снижение ИАМ – на 35,5%, СПА – на 36,3%, КУЭ – на 9,91% ($p < 0,05$) (приложение 4). Очевидно, опытные препараты уменьшают способность кишечных палочек к адгезии на мембраны клеток животных. Можно предположить, что данное

явление вызвано образованием комплексов препарата с фимбриальными структурами – адгезинами, и/или их деструктивным действием. Стоит заметить, что образец рутина повышает коэффициент участия эритроцитов.

3.5. Влияние растительных и грибных метаболитов на алиментарную активность *E. coli*:

3.5.1 утилизация белкового компонента среды. Основным источником азота является пептон, который представляет собой продукт неполного ферментативного гидролиза белков, состоящий из отдельных аминокислот, ди-, три- и полипептидов. Пептон расщепляется комплексом экзоферментов до аминокислот, которые простой диффузией проникают в клетку.

При совместном инкубировании с препаратами биофлавоноидов гречихи, гордецина, метаболитов *T. atrobrunneum* и *T. lixii* Pat наблюдалось резкое сокращение потребления пептона среды на: 32,4%, 23,4%, 41%, 24,2% ($p < 0,05$) соответственно. Количество белка в экстракте биомассы уменьшилось на 58,1%, 19,2%, 49,4%, 23,6%. ($p < 0,05$) и коррелирует со снижением утилизации пептона ($r = 0,847$, $p = 0,001$). Данная зависимость подтверждается изменением удельной активности протеаз, коррелирующим с показателями концентрации белкового компонента клетки и среды: $r = 0,911$ и $r = 0,909$, соответственно ($p < 0,05$) (рисунок 7).

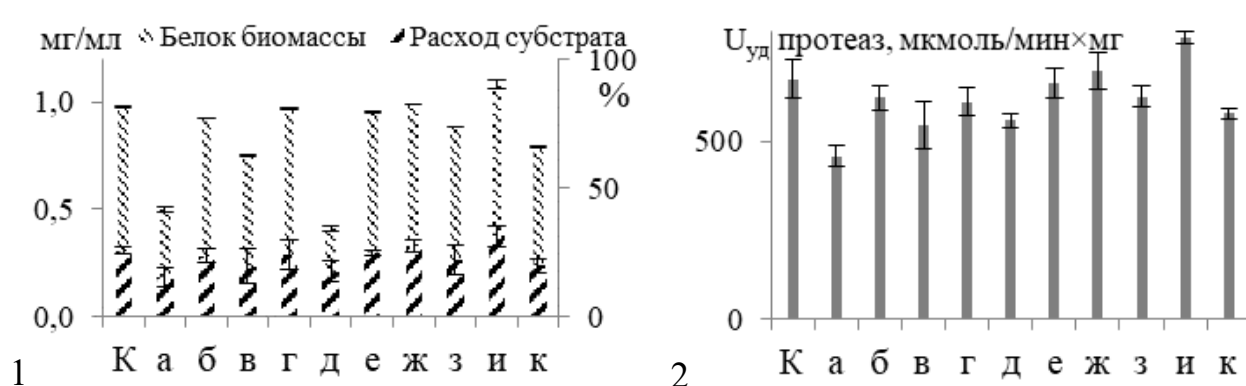


Рисунок 7. Показатели активности утилизации *E. coli* пептона: 1 – баланс белка биомасса/среда; 2 – удельная активность протеаз. а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды,

е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

Стоит отметить, что изменение количества белка в биомассе не отражается на его качественном составе (рисунок 8).

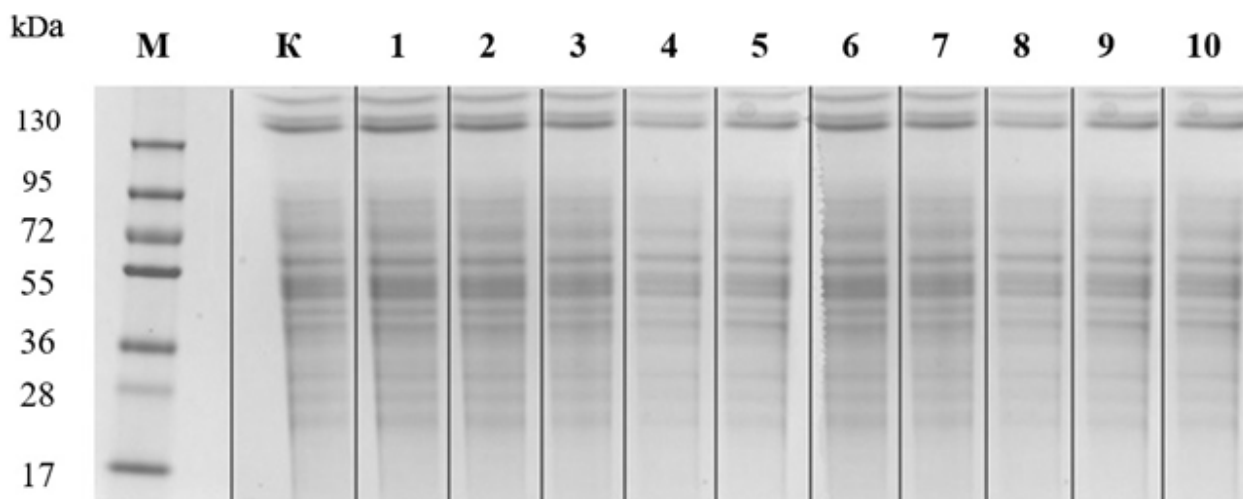


Рисунок 8 – Электрофореграмма белков, окраска Кумаси: а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

3.5.2 утилизация углеводного компонента среды. В эксперименте с клиническим штаммом *E. coli*, та же группа препаратов оказывает аналогичное действие на показатели утилизации источника углерода. В эксперименте с биофлавоноидами гречихи расход субстрата снизился на 40,9%, удельная активность β -галактозидазы на 45,9%; с гордецином – на 19,9% и 11,5%, метаболитами *T. atrobrunneum* – на 27,8% и 25,3%, и *T. lixii* Pat – на 22,6% и 17,5%. Эти показатели коррелируют с $r=0,98$ ($p<0,05$) (рисунок 9).

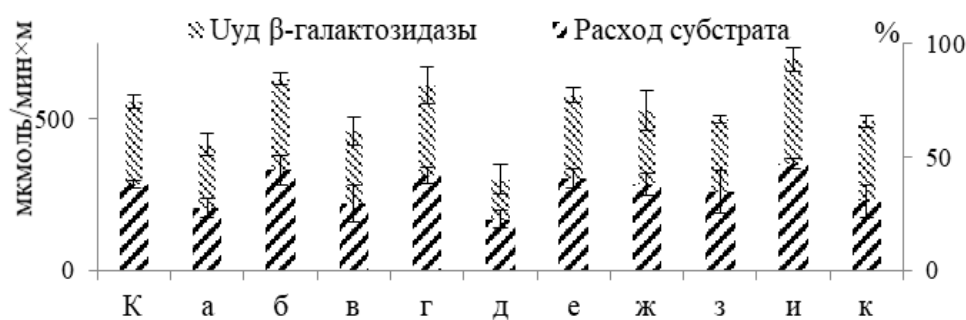


Рисунок 9. Показатели активности утилизации *E. coli* углеводного компонента среды: а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii Pat*, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

3.6. Влияние растительных и грибных метаболитов на антиоксидантный статус бактериальной клетки

Известно, что соединения растительного происхождения имеют как антиоксидантную активность, так и способны выступать в качестве прооксидантов, в особых условиях генерируя активные формы кислорода.

Оценка системы антиоксидантной защиты показала резкое повышение удельной активности супероксиддисмутазы и каталазы в эксперименте с образцом препарата биофлавоноидов гречихи. Превышение показателей интактной культуры составило в 12,8 и 8,37 раз, в абсолютных цифрах 3270,5 и 841,3 мкмоль/мин×мг, соответственно ($p < 0,05$). Прочие образцы из тестируемой группы повышали активность ферментов в пределах 0,8-16%. показатели СОД и КАТ снижались при совместной инкубации с дигидрокверцетином на 17,8% и 4,6%, и рутином на 1,4% и 0,9% соответственно ($p < 0,05$), что говорит о их антиоксидантной активности при заданной концентрации в среде (рисунок 10).

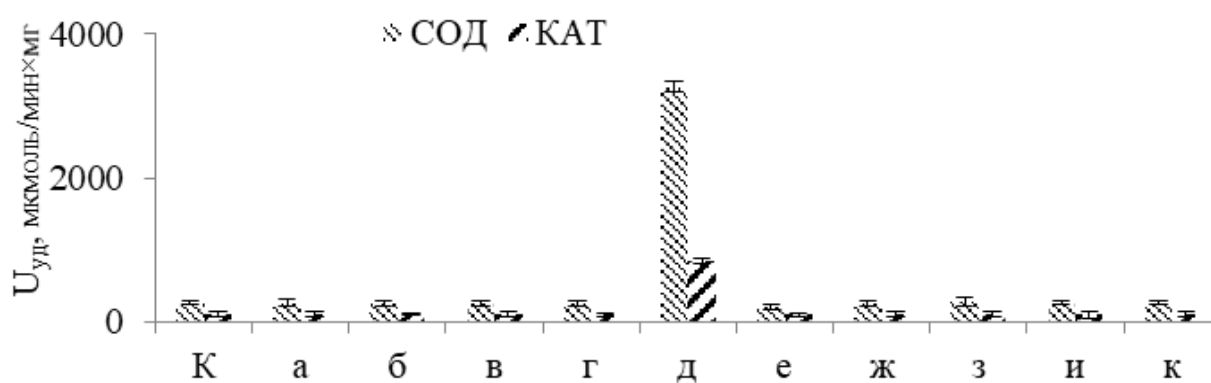


Рисунок 10. Показатели активности ферментов антиоксидантной защиты *E. coli*: а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii Pat*, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

Так же известно, что препараты биогенных фенолов способны к цитотоксическому действию за счет образования разрывов цепей ДНК [104, 126]. Препарат биофлавоноидов гречихи – единственный образец, оказавший влияние на целостность ДНК бактерии. На электрофореграмме наблюдается фрагментация молекулы, в виде «лестницы» (рисунок 11).

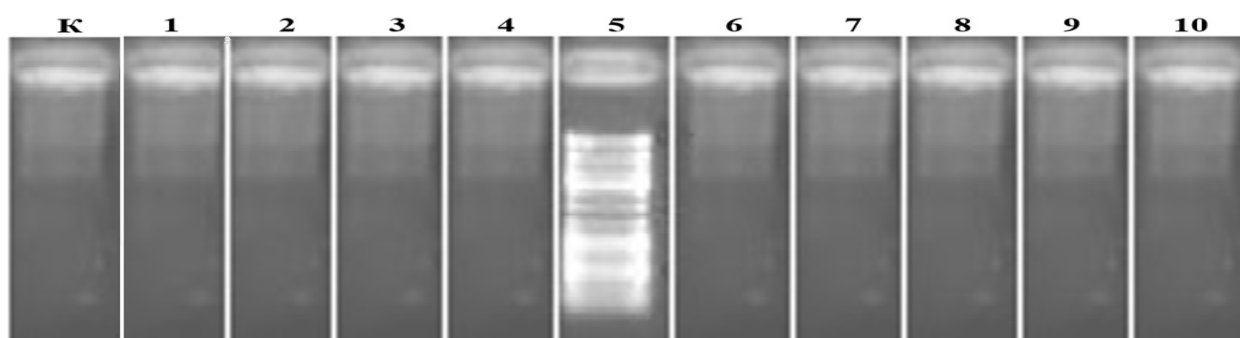


Рисунок 11. Электрофореграмма ДНК *E. coli*: 1 – *T. atrobrunneum*, 2 – *T. lignorum*, 3 – *T. lixii* Pat, 4 – *T. viride*, 5 – биофлавоноиды, 6 – дигидрокверцетин, 7 – рутин, 8 – рутифлав, 9 – авенацин, 10 – гордецин.

Можно предположить, что препарат биофлавоноидов индуцирует окислительный стресс, в следствии чего и наблюдается подобный всплеск активности системы антиоксидантной защиты *E. coli*. Однако адаптивный эффект такого уровня оказался недостаточен, что в последствии привело накоплению активных форм кислорода и деструкции ДНК, за счет прямого воздействия на молекулу.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в представленной подборке исследуемых препаратов отмечается разделение по специфичности действия: дигидрокверцетин, рутин, авенацин и метаболиты *T. lignorum*, *T. viride* эффективно угнетают рост фитопатогенной микрофлоры, оказывая на условно-патогенные бактерии слабый бактериостатический и/или ростостимулирующий эффект. У метаболитов *T. atrobrunneum* наблюдается противоположная специфичность. Препараты биофлавоноидов, рутифлав, гордецин и метаболиты *T. lixii* Pat обладают широким спектром действия при средней и высокой бактериостатической

активности, в разной степени угнетая рост условно- и фитопатогенной микрофлоры.

В отношении клинических и контрольных штаммов *E. coli*, биофлавоноиды гречихи проявляют выраженный бактериостатический эффект, за счет прооксидантного действия. Эффективная концентрация препарата токсична для млекопитающих [39], что исключает его применение внутрь, но оставляет возможным использование в качестве компонента антисептических растворов.

Препарат под торговой маркой «Рутифлав» обладает схожим с биофлавоноидами, но в разы менее выраженным действием. Данный факт объясняется концентрацией рутина [15], нивелирующей бактериостатический эффект сопутствующих флавоноидных компонентов.

Метаболиты *T. atrobrunneum* и *T. lixii* Pat показывают симметричность направленности действия, нарушая функциональный статус клеточной стенки *E. coli*. Однако в серии испытаний суммарный результат с большей эффективностью показал штамм *T. atrobrunneum* (справка о депонировании ВКПМ F-1434 от 4 мая 2018 г.).

3.7. Применение растительных и грибных метаболитов в составе средства для предпосевной обработки семян.

Препарат биофлавоноидов гречихи и метаболиты грибов *Trichoderma spp.* использованы в составе средства для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта (Патент – 2626174 РФ, бюллетень №21, опубликован 21.07.2017), а так же могут быть использованы для оздоровления пробирочных растений картофеля при производстве семенного безвирусного посадочного материала из меристемных линий (таблица 6, приложение 6).

Таблица 6 Контаминация посадочного материала растений после предпосевной обработки комплексным препаратом.

Питательная среда	Культуры растений
-------------------	-------------------

	экспланты		in vitro	
	Контаминация, %			
	бактерии	грибы	бактерии	грибы
предлагаемая	20±1,6	30±0,9	-	-
известная			20±1,2	30±1,8

Предпосевная обработка семян осуществляемая веществами, обладающими защитно-стимулирующим действием, повышающими иммунитет, способствующими увеличению ростовой активности растений, защите их от болезней и вредителей и в конечном итоге повышению урожайности. Для повышения эффективности известное средство, содержащее салициловую кислоту, лектины, источник магния, дополнительно обогащали препаратами биофлавоноидов гречихи, метаболитами грибов *Trichoderma* spp., гуминовыми кислотами, лектинами сои (таблица 7, 8).

Таблица 7 Урожайность перца «Калифорнийское чудо»

Вариант	Урожайность, т/га
Контроль (без обработки)	46,8±3,1
Контроль («Эпин-Экстра»)	50,8±2,6
Предлагаемое средство	65,4±5,9

Предпосевная обработка семян перца сорта «Калифорнийское чудо» предлагаемым средством повышает урожайность до 65,4 т/га, в то время как в контрольном варианте с использованием препарата «Эпин-Экстра» урожайность составляет 50,8 т/га, а в контрольном варианте без обработки – 46,8 т/га.

Таблица 8 Развитие болезней и урожайность томатов сорта «Сердцеед».

Варианты	Урожайность, кг/м ²	Растения, пораженные болезнью, %
Контроль (без обработки)	2,1±0,2	5,7±0,6
Контроль («Эпин-Экстра»)	3,0±0,1	1±0,09

Предлагаемое средство	3,9±0,6	-
-----------------------	---------	---

Предпосевная обработка семян томатов сорта «Сердцеед» предлагаемым средством повышает урожайность до 3,9 кг/м², в то время как в контрольном варианте с использованием препарата «Эпин-Экстра» урожайность составляет 3,0 кг/м², а в контрольном варианте без обработки – 2,2 кг/м².

3.8. Подбор субстрата для глубинного культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

На первом этапе исследования анализировали рост мицелиального гриба на различных питательных средах по диаметру колоний на 5-7 сутки культивирования (рисунок 12).

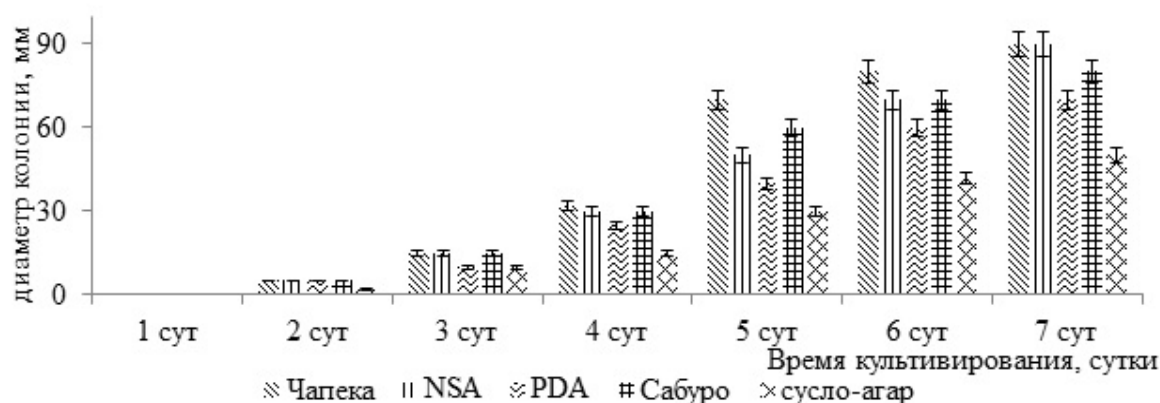


Рисунок 12 – Рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на различных питательных средах.

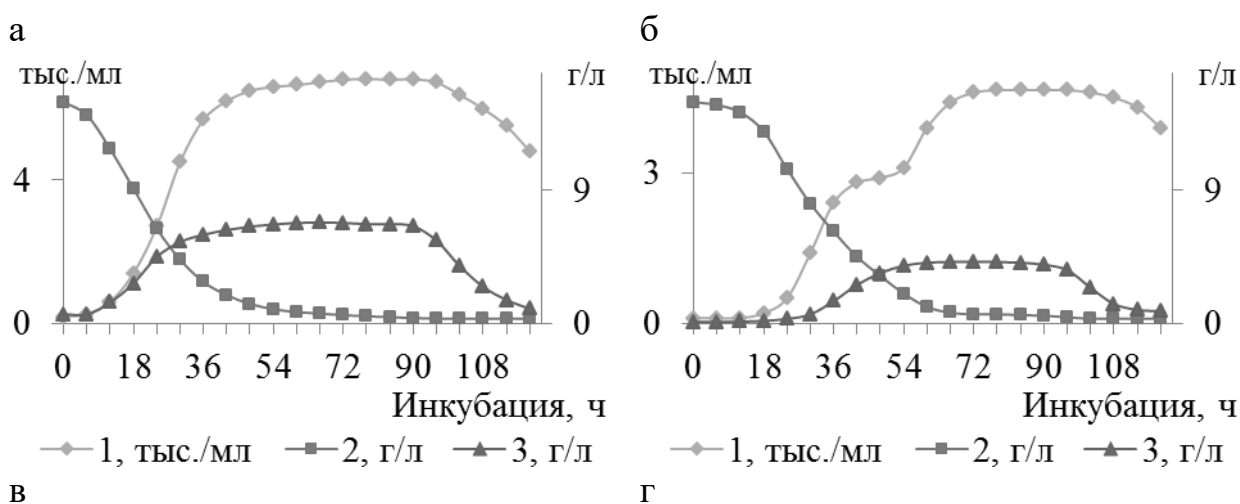
На среде Чапека рост гриба очень быстрый – 70±5 мм на 5 сутки инкубирования, к 7 суткам зарастает вся чашка Петри (90 мм). Мицелий белого цвета до 2 мм в высоту, спороношение обильное, концентрическими зонами. На среде NSA микромицет вырастает до 90 мм за 7 суток. Воздушный мицелий практически отсутствует, спороношение среднее. На сусло-агаре рост до 50±5 мм на 7 сутки культивирования. К 10 суткам зарастает вся чашка Петри. Мицелий средний, спороношение среднее. На среде PDA микроорганизм вырастает до 60 мм за 7 суток. Мицелий до 1 мм в

высоту, спороношение обильное. На среде Сабуро рост быстрый, обильный – 80 мм на 7 сутки, мицелий до 2 мм в высоту, спороношение среднее. По результатам опыта определили физиологическую зависимость диаметра колонии *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от величины рН питательной среды.

Наиболее обильный, быстрый рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 соответствует самому высокому значению рН (из представленного набора сред) и уменьшается по мере закисления среды. Оптимальным рН для культивирования является $7,0 \pm 2$.

Таким образом, исходя из полученных данных роста культуры и реологических свойств питательных сред, применительно к глубинному культивированию, оптимальной для выращивания *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 методом глубинного культивирования является среда Чапека.

Для установления оптимального углеводного компонента питательной среды для биосинтеза низкомолекулярных бактериостатических метаболитов культурой *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 оценивали влияние лактозы, сахарозы, глюкозы и фруктозы на параметры роста культуры в условиях глубинного периодического культивирования (рисунок 13). Для приготовления среды использовали солевую основу среды Чапека с полной рецептурной навеской по углеводу.



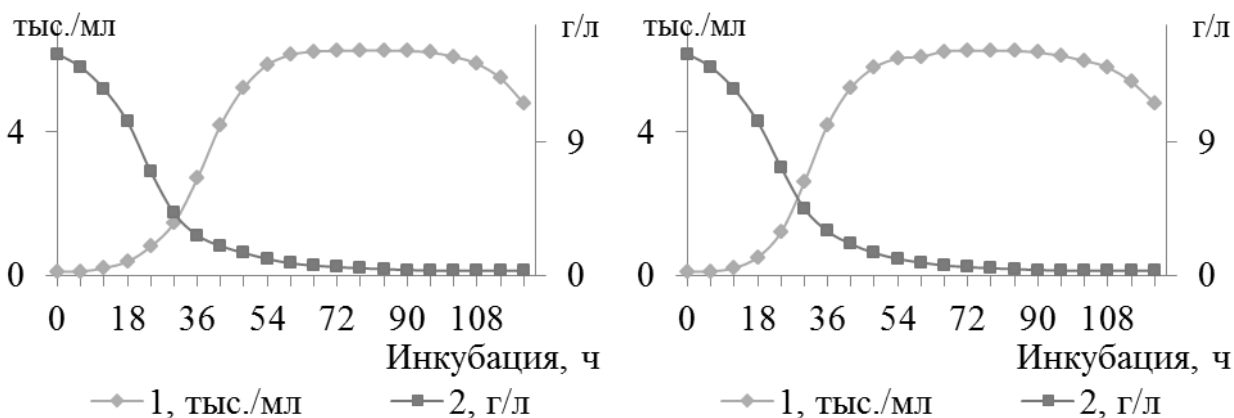


Рисунок 13. Кривые роста *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в среде с: а – сахарозой; б – лактозой; в – глюкозой; г – фруктозой; 1 – биомасса; 2 – субстрат; 3 – редуцирующие вещества.

На рисунке 13 показано, что продолжительность лаг-фазы при использовании рецептурной навески сахарозы, минимально, что предполагает быстрый выход на фазу экспоненциального роста. Параметры кинетики роста культуры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в заявляемых условиях представлены в таблице 9.

Таблица 9. Параметры кинетики роста культуры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в условиях культивирования с различным углеводным компонентом среды.

Углеводный компонент	Параметры ($\bar{x} \pm \sigma$)					
	μ , ч ⁻¹	g, ч	ν , делений/ч	n, делений	Y^*	q, г/КОЕ×ч×л
лактоза	0,054 ±0,01	12,76 ±0,1	0,078 ±0,01	12,078 ±0,2	2,46 ±0,2	0,022 ±0,01
сахароза	0,084 ±0,01	8,26 ±0,9	0,121 ±0,02	12,121 ±0,02	0,938 ±0,07	0,104 ±0,04
глюкоза	0,058 ±0,01	11,99 ±2,4	0,083 ±0,01	12,083 ±0,8	1,4 ±0,1	0,041 ±0,01
фруктоза	0,057 ±0,01	12,464 ±0,7	0,08 ±0,01	12,08 ±1,0	0,777 ±0,2	0,071 ±0,01

*рассчитывали по приросту сырой биомассы

В приведенной таблице показано, что на обозначенных субстратах удельная скорость роста биомассы в среднем составила $0,063 \pm 0,01$ ч⁻¹.

Максимальное значение показателя установлено в варианте опыта с сахарозой $0,084 \pm 0,01 \text{ ч}^{-1}$. При этом в процессе культивирования, кривая прироста биомассы получила S-образный изгиб с образованием промежуточного комплекса {(фаза замедления 1)-(стационарна фаза 1)-(лаг-фаза 2)}. Очевидно, это может быть связано с явлением насыщения субстратом, т.к. утилизация одной молекулы сахарозы приводит к высвобождению двух молекул моносахаридов: глюкозы и фруктозы, которые, в свою очередь, так же являются субстратами для *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

По мере утилизации сахарозы, глюкоза и фруктоза, накапливаясь, создают критическую концентрацию, при которой происходит замедление прироста биомассы. В сложившейся ситуации имеет место культивирование в продленной периодической системе, с подпиткой среды за счет самообогащения при расщеплении первичного субстрата на вторичные.

По результатам эксперимента, в среднем время генерации культуры (g) составило $11,369 \pm 2,1$ ч. Максимальное значение g определяется при использовании в качестве углеводного компонента питательной среды лактозы и составляет $12,762 \pm 0,1$ ч, тогда как у сахарозы, глюкозы и фруктозы этот показатель выше на $35,27/6,05/2,33\%$, соответственно. Другими словами, период, в течение которого осуществляется деление клетки, сокращается в порядке: лактоза > фруктоза > глюкоза > сахароза, следовательно, скорость деления (v) и число клеточных делений (n) изменяются обратно и прямо пропорционально времени генерации, соответственно.

Для оценки ферментативной активности продуцента рассчитывали метаболический коэффициент (q) – удельную скорость метаболизма, выраженную скоростью потребления субстрата культурой в данный момент времени. Данный показатель обратно пропорционален экономическому коэффициенту (Y), характеризующему количественную потребность

организма в субстрате, он определяется как выход биомассы по утилизированному субстрату.

Из экспериментальных данных вычислено, что метаболическая активность *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 изменяется в порядке: сахароза>фруктоза>глюкоза>лактоза. Наибольшей величины данный показатель достиг в опыте с сахарозой и составил $0,104 \pm 0,04$ г/КОЕ \times ч \times л, что соответствует наименьшему экономическому коэффициенту – $0,938 \pm 0,07$. Очевидно, сахароза является оптимальным компонентом питательной среды, в которой возможен рациональный прирост биомассы, необходимый для биосинтеза целевого продукта.

Для расчета K_s , μ_m , строили графики зависимости $1/\mu_0 = f(1/S_0)$, используя параметры роста *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, полученные при глубинном культивировании (рисунок 14).

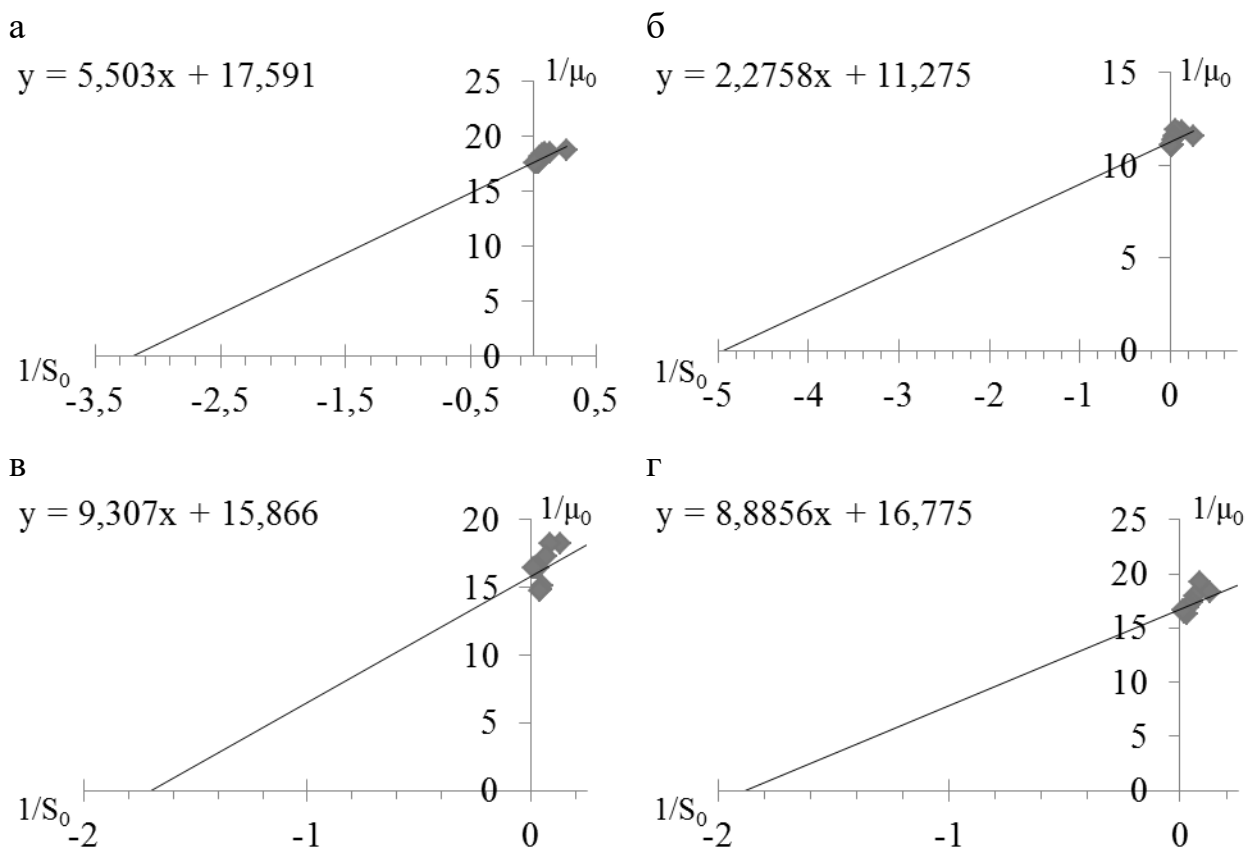


Рисунок 14. График зависимости удельной скорости роста культуры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от концентрации субстрата: а – лактозы; б –

сахарозы; в – глюкозы; г – фруктозы в координатной системе Лайнуивера-Берка.

На основании графоаналитического эксперимента были получены значения субстратной константы и максимальной удельной скорости роста, представленные в таблице 10.

Таблица 10. Константы кинетики роста культуры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в условиях культивирования с различным углеводным компонентом среды.

Кинетические константы	Углеводы ($\bar{x} \pm \sigma$)			
	лактоза	сахароза	глюкоза	фруктоза
K_S , г/л	0,328±0,2	0,202±0,2	0,587±0,1	0,53±0,1
μ_m , ч ⁻¹	0,059±0,01	0,089±0,01	0,063±0,01	0,06±0,01

Субстратная константа (K_S) и максимальная удельная скорость (μ_m) являются наиболее важными характеристиками кинетики роста микроорганизмов, обоснованы физиолого-биохимическими особенностями штамма, условиями культивирования, природой утилизируемого субстрата и его концентрацией в среде. Так, K_S характеризует сродство субстрата и ферментов клетки, при этом обратно пропорциональна μ_m .

По совокупности результатов установлено, что из представленных субстратов наименьшее значение субстратной константы определяется в опыте с сахарозой, K_S сахарозы равна 0,202±0,2 г/л, что на 50,9% ниже среднего значения. Этот факт свидетельствует о максимальном сродстве культуры к данному субстрату, в рамках поставленного эксперимента. Максимальная удельная скорость роста *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в среднем составила 0,068±0,01 ч⁻¹. Минимальные значения μ_m показали постановки с лактозой и фруктозой на 12,91% и 11,43% ниже среднего, соответственно. Наибольшее значение определено в опыте с сахарозой 0,089±0,01 ч⁻¹, что подтверждается соответствующим значением K_S .

По совокупности полученных экспериментальных данных установлено, что наиболее подходящим углеводным компонентом в питательной среде для продуцента низкомолекулярных бактериостатических соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, является сахароза. Можно предположить, что она имеет наибольшее сродство с сахаролитическим комплексом гриба ($K_S = 0,202 \pm 0,2$ г/л; $\mu_m = 0,089 \pm 0,01$ ч⁻¹); в то время как сродство остальных углеводов уменьшается в порядке: лактоза > фруктоза > глюкоза.

В присутствии сахарозы рост биомассы мицелия идет быстрее: время генерации сокращено на 27,34%, метаболический коэффициент выше на 74,79% от среднего.

Для установления оптимальных условий для протекания реакции расщепления сахарозы и контроля этого процесса определяли кинетические характеристики фермент-содержащего экстракта биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. На рисунке 15 приведены значения удельной активности сахаразы в экстракте биомассы, под влиянием варьируемых параметров.

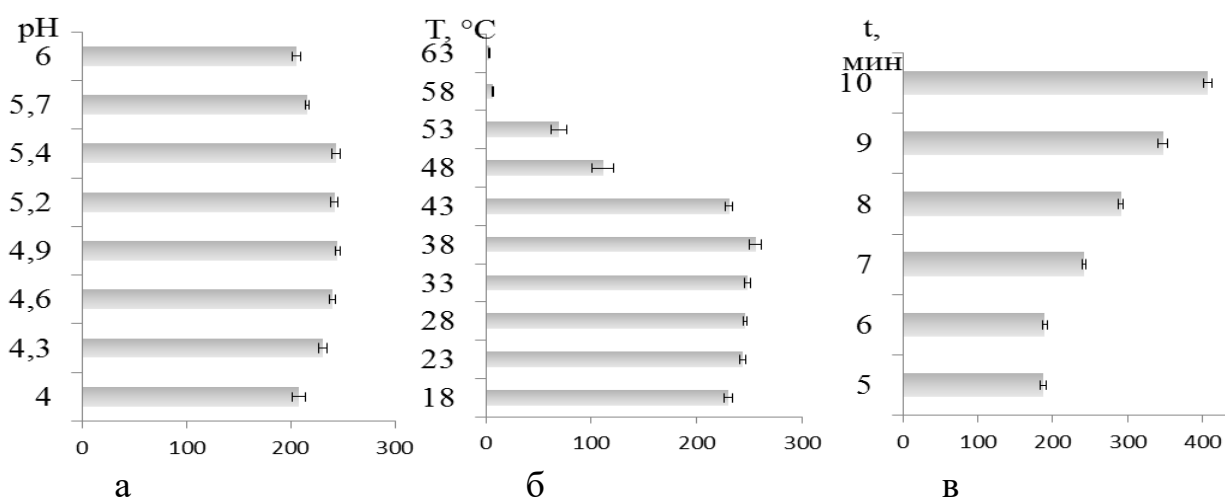


Рисунок 15 – Удельная активность сахаразы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 ($\bar{U}_{уд} \pm \sigma$, мкмоль/мин×мг) под влиянием изменения а – pH среды; б – температуры; в – времени инкубации.

Согласно диаграммам среднее значение удельной активности сахаразы в пределах оптимального интервала pH составило $242,67 \pm 3,0$ мкмоль/мин×мг; $C_V = 1,27\%$. Смещение pH на 0,5 снижает удельную

активность на 4,96-15,23%. Наибольший показатель активности определен при температуре 38°C и составил $255,55 \pm 5,4$ мкмоль/мин×мг, минимальная активность $3,41 \pm 0,5$ мкмоль/мин×мг установлена при 63°C, выявлен оптимальный температурный интервал 23-33°C со средним значением удельной активности $245,99 \pm 2,4$ мкмоль/мин×мг; $C_v = 0,99\%$. Увеличение температуры свыше 38°C снижает активность на 9,75-98,66%, в дальнейшем инкубация при $T < 43^\circ\text{C}$ нецелесообразна. Относительно времени реакции удельная активность изменяется пропорционально показателю времени (в заданном интервале), и с 5 по 10 минут увеличивается от $187,32 \pm 3,6$ до $406,34 \pm 5,8$ мкмоль/мин×мг.

Таким образом, из вышеизложенного можно заключить, что оптимальные условия для ферментативной реакции создаются в течение $t = 7$ минут, при $T = 28^\circ\text{C}$ в среде с $\text{pH} = 5,2$; усредненное значение $U_{\text{уд}} = 243,22 \pm 0,7$ мкмоль/мин×мг.

Так же из результатов эксперимента очевидно, что концентрация субстрата убывает в зависимости от времени по кривой, линеаризировав которую, получали график функции $\ln S = f(t)$ (рисунок 16)

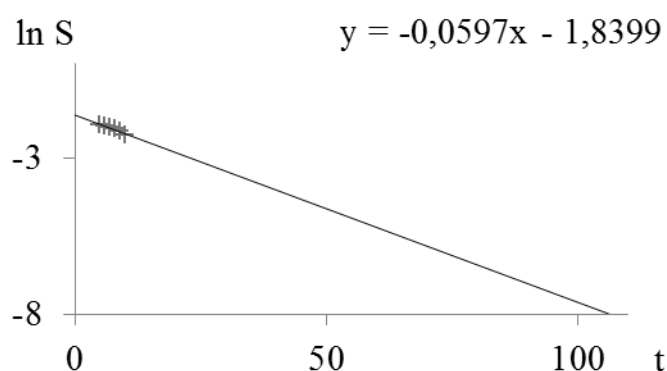


Рисунок 16 – Зависимость логарифма концентрации от времени для реакции расщепления сахарозы.

Графическим методом определяется первый порядок реакции, следовательно, уравнение скорости реакции будет иметь вид $v = k_1(S_0 - S) =$

dS/dt . Проинтегрировав, получали $\ln S_0 = \ln(S_0 - S) - k_1 t$, откуда находили значение константы скорости $k_1 = \frac{1}{t} \times \ln \frac{S_0}{S_0 - S}$ (1).

Рассчитав константы скорости при каждой температуре инкубации (рисунок 17а), получали экспоненциальную зависимость между данными величинами, которая описывается уравнением Аррениуса: $k = A \times e^{-E_a/RT}$. Проинтегрировав получали линейную функцию $\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T}$ (2)

(рисунок 17б):

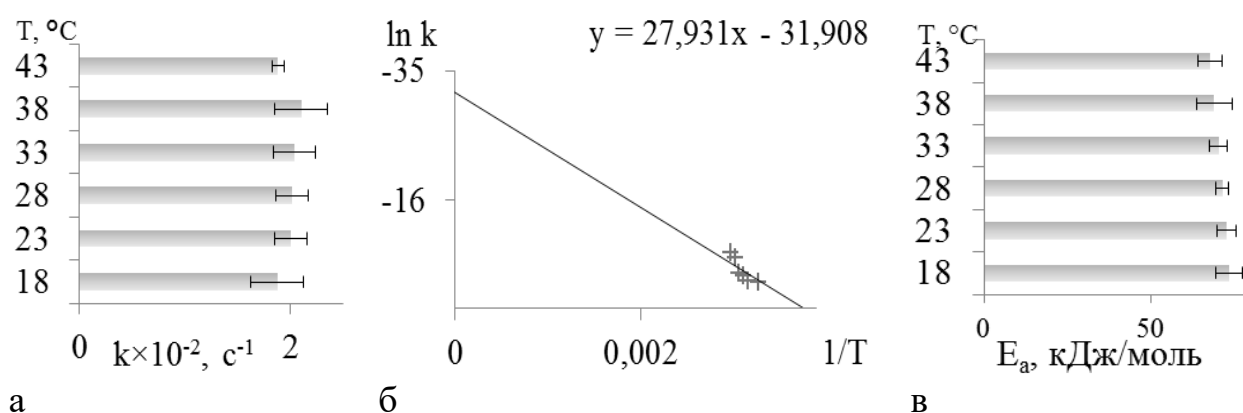


Рисунок 17 – Влияние температуры на константу скорости и энергию активации.

По данным графика находили предэкспоненциальный множитель, натуральный логарифм которого численно равен значению коэффициента смещения, следовательно $A = e^{-31,908} = 1,388 \times 10^{-14} c^{-1}$ – постоянная величина. Из равенства (2) находили энергию активации: $E_a = RT \times \ln \frac{k}{A}$.

На диаграмме (рисунок 17в) представлены значения энергии активации в указанном температурном диапазоне, где видно, что в пределах оптимума E_a изменяется незначительно, это так же подтверждает правильность выбора режима инкубации реакционной смеси. Так, повышение температуры ожидаемо приводит к уменьшению энергии активации, следовательно, и к увеличению значения константы скорости.

Для определения влияния концентрации субстрата на скорость реакции ставили серию опытов с варьированием концентрации сахарозы. В оптимизированных условиях измеряли удельную активность в разведениях от 0,05 до 0,275 с шагом в 0,025 моль/л и пересчитывали в скорость (моль/мин×л), при $T=28^{\circ}\text{C}$ $k=2,01\times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$. В результате установили зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, имеющую параболический график (рисунок 18.1), следовательно описывается уравнением Михаэлиса-Мэнтен. Графоаналитически определяется, что насыщающая концентрация сахарозы $S=0,25$ моль/л ($V=4,004\pm 0,02\times 10^{-4}$ моль/мин×л; $U_{\text{уд}}=468,945\pm 3,1$ мкмоль/мин×мг). Используя метод двойных обратных величин Лайнуивера-Берка получена линейная функция $1/V = f(1/S)$: $\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_m} \times \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_m}$ (рис 18.2).

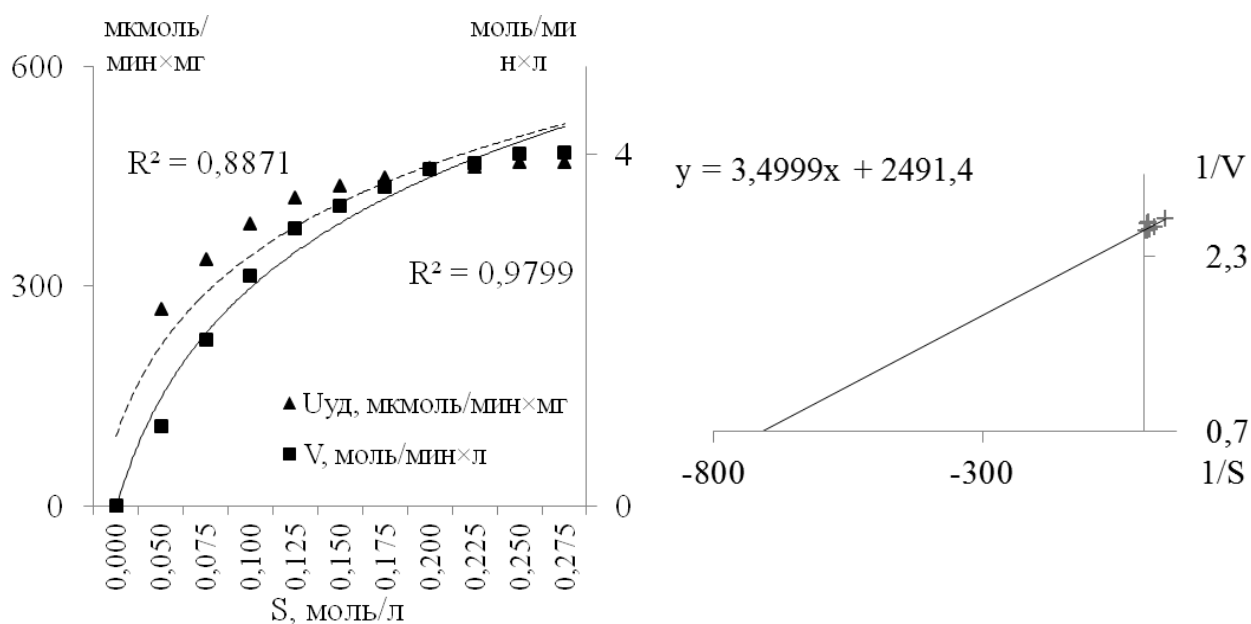


Рисунок 18 – 1. График зависимости удельной активности и скорости ферментативной реакции ($\times 10^{-4}$) от концентрации сахарозы; 2. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата.

По рисунку 18, с помощью линейной аппроксимации, получили уравнение функции $1/V = f(1/S)$, в котором $K_M = 3,4999/2491,4 = 1,404\times 10^{-3}$

моль/л, при этом $V_m = 1/2491,4 = 4,013 \times 10^{-4}$ моль/мин×л – постоянные величины.

3.9. Оптимизация питательной среды и условий культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Соответствуя сгенерированной матрице планирования, реализовали 8 опытов культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Исходные параметры представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Варианты экспериментов культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

№	X ₁	X ₂	X ₃	Y _{cp}
1	1	10	30	10,1
2	0,5	10	30	10,3
3	1	5	30	10,8
4	0,5	5	30	11,2
5	1	10	15	16,7
6	0,5	10	15	17,8
7	1	5	15	19,7
8	0,5	5	15	22,1

Корреляционный анализ показал, что в предлагаемой модели наибольшее влияние на синтетическую активность оказывал фактор X₃ (концентрация сахарозы), $r = -0,944$ (таблица 12).

Таблица 12 – Корреляционная матрица.

	Y _{cp}	X ₁	X ₂	X ₃
Y _{cp}	1			
X ₁	-0,11417	1		
X ₂	-0,24784	0	1	
X ₃	-0,944	0	0	1

С помощью тестов Дарбина-Уотсона ($DW = 0,94$; $d_L = 0,368$; $d_U = 2,287$) и Бреуша-Годфри ($T = 1,16$; $t_{кр} = 2,3646$) установили отсутствие автокорреляции между объясняемыми переменными, тестом Уайта исключили гетероскедастичность.

В результате обработки данных получили значения коэффициентов уравнения регрессии: $b_0 = 32,425 \pm 2,2$ ($p=0,0001$), $b_1 = -2,05 \pm 1,67$ ($p=0,2856$), $b_2 = -0,445 \pm 0,17$ ($p=0,0556$), $b_3 = -0,565 \pm 0,055$ ($p=0,0005$), среди которых значимыми признаны b_0 и b_3 ($p < 0,05$), при которых модель адекватна исходным данным. Таким образом, уравнение регрессии получило вид:

$$Y = 32,425 - 0,565X_3; R^2 = 0,965,$$

На основании выше изложенного установили, что оптимальная концентрация сахарозы равна 15 г/л и составляет 50% от навески стандартной рецептуры среды Чапека. В данном случае наблюдали максимальные значения диаметра зон подавления роста *E. coli*, что говорит о наибольшей синтетической активности *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

В процессе исследования определили зависимость прироста биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от концентрации сахарозы ($r = +0,95$). Рецептурная навеска углевода стимулировала накопление биомассы продуцента, которое в свою очередь приводило к уменьшению диаметра зон подавления роста *E. coli*, ($r = -0,98$) (рисунок 19).

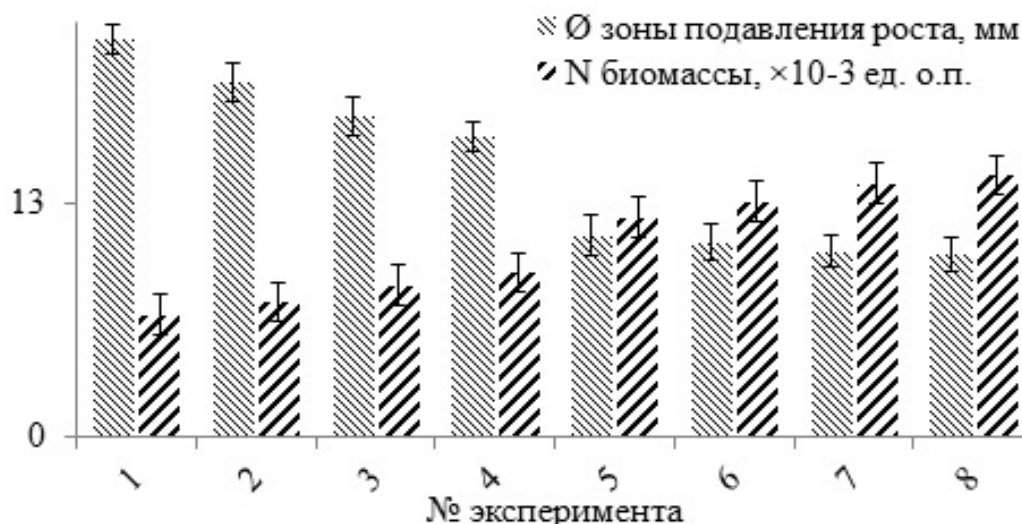


Рисунок 19 – Зависимость между приростом биомассы *T. atrobrunneum* F-1434 и диаметром зоны подавления роста *E. coli*. $r = -0,99$; $p < 0,05$.

Так же стоит отметить, что при инокуляции высокой дозы культуры продуцента наблюдали быстрое истощение субстрата, сопровождаемое

споруляцией на 3-4 сутки культивирования. Отдельно касаясь эффекта споруляции, необходимо сказать, что данное явление наблюдалось и в оптимизированных условиях при культивировании свыше 5 суток, а так же во всех вариантах эксперимента при воздействии естественного и/или искусственного освещения.

Таким образом, по совокупности результатов исследований был установлен оптимальный режим культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434: сахароза – 15 г/л, NaNO₃ – 2 г/л, K₂HPO₄ – 1 г/л, MgSO₄×7 H₂O – 0,5г/л, KCl – 0,5 г/л, FeSO₄ – 0,1 г/л, температура – 28 °С, перемешивание – 120 мин¹, посевная доза – 0,5 % (v/v), время инкубации – 5 суток. На рисунке 20 отображены динамика исследуемых параметров культивирования в оптимизированных условиях.

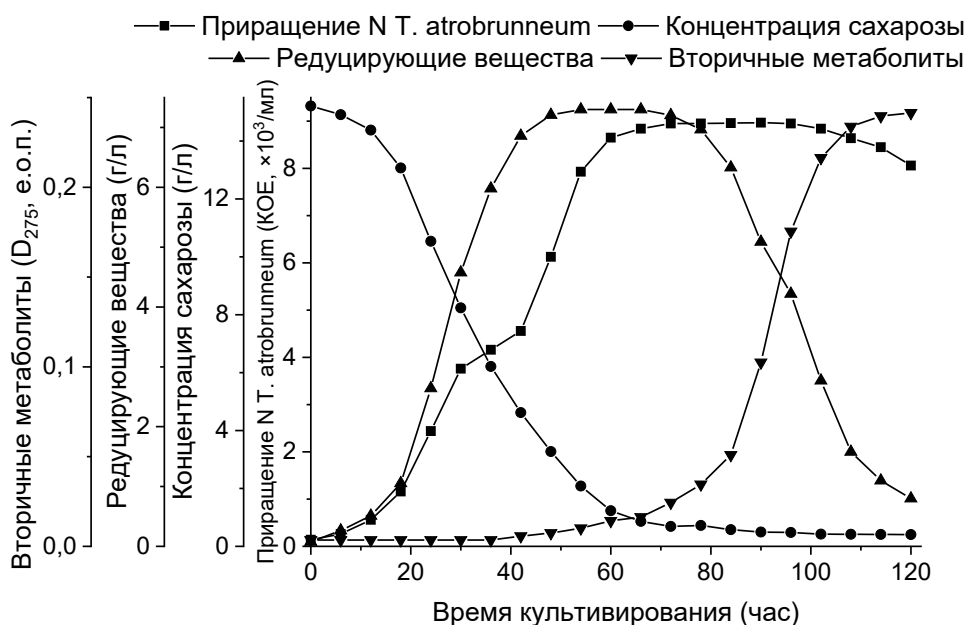


Рисунок 20 – Параметры культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

3.10. Влияние экстрагентов на антибиотическую активность метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Выделение бактериостатических метаболитов контролировали по антибактериальной активности экстрактов из КЖ в отношении тест-штаммов *Aspergillus niger*, *E. coli*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* (рисунок 21, таблица 13).

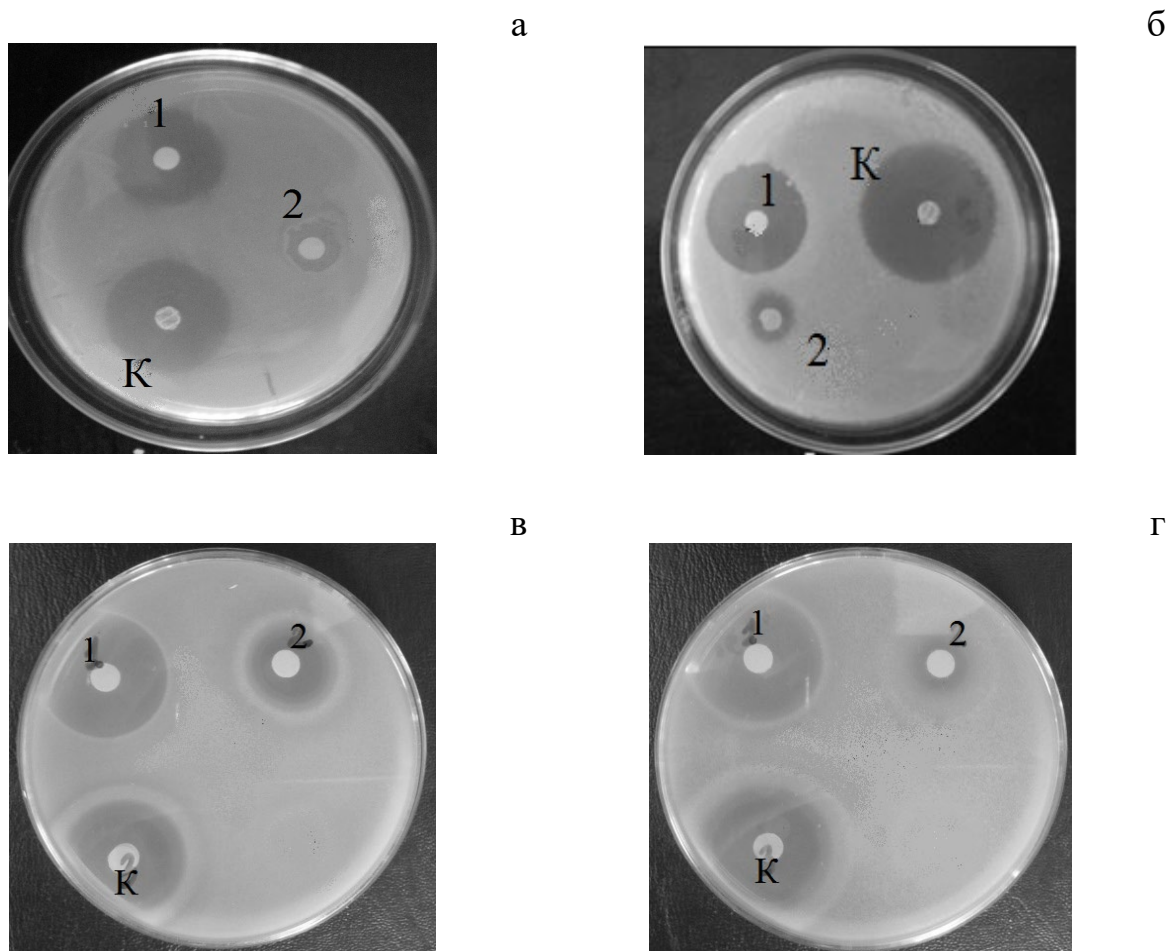


Рисунок 21 – Чувствительность микроорганизмов к препарату метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434: а – *E. coli* АТСС; б – *B. coagulans*; в – *B. subtilis*; г – *B. anthracis*; К – ципрофлоксацин; 1 – экстракция этилацетатом; 2 – экстракция бутанолом.

Таблица 13 – Бактериостатическая активность экстрактов из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в отношении тест-штаммов.

Тест-штаммы	Ø зона подавления роста $X_{cp} \pm \sigma$, мм		
	этилацетат	бутанол	Ципрофлоксацин
<i>E. coli</i>	22,0±0,3	14,0±0,05	22,2±0,05
<i>B. coagulans</i>	33,4±0,2	12,0±0,2	33,0±0,2
<i>B. subtilis</i>	23,5±0,2	18,0±0,3	23,2±0,3
<i>B. anthracis</i>	23,0±0,5	13,0±0,1	24,6±0,1

В спиртовом растворе препарат представляет собой маслянистую жидкость оранжевого цвета, при стоянии в холоде оседает в виде капель, при взбалтывании переходит в эмульсию. Растворим в этилацетате, ацетоне, ацетонитриле. В аналогичной схеме выделения метаболитов полярным растворителем наблюдалось выраженное снижение бактериостатической активности.

Рабочий раствор, имеет желтый оттенок, прозрачен и/или слегка опалесцирует. УФ-спектр определяли на спектрофотометре СФ-52 (ЛОМО, Россия), в котором максимум поглощения отмечен на длине волны 275 нм. После ТСХ в системе хлороформ:метанол (3:1) определяется и биоавтографии на тест-микроорганизме *E. coli*, установлено значение R_f активной фракции метаболитов, численно равное 0,44 (рисунок 22).

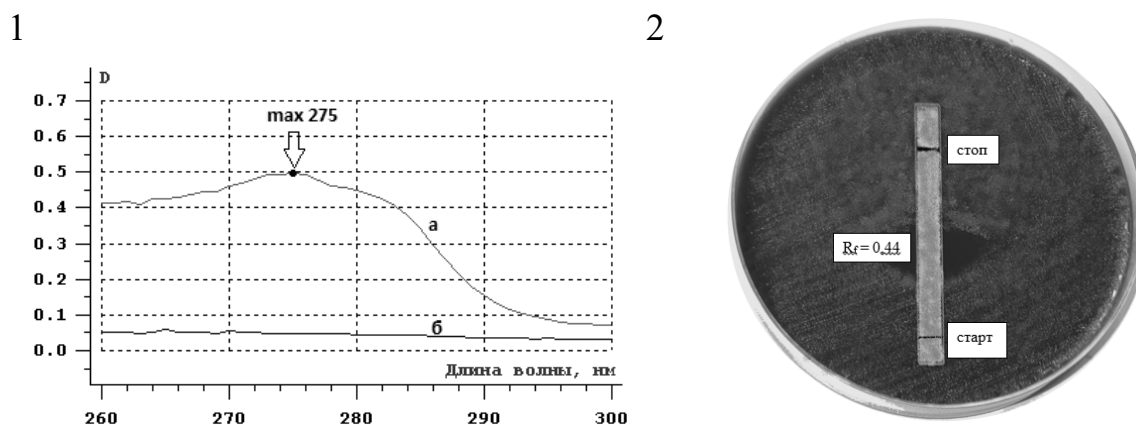


Рисунок 22 – (1) УФ - спектр этилацетатного экстракта из КЖ: а – экстракт; б – растворитель (этилацетат); (2) Биоавтография этилацетатного экстракта из КЖ на тест-микроорганизме *E. coli*.

УФ-спектр указывает на возможность присутствия в экстракте КЖ соединений, содержащих ароматические группы.

ГЛАВА 4. ЛАБОРАТОРНЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ГРИБОВ *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И АНТИГРИБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.

Настоящий лабораторный технический регламент распространяется на биологически активные соединения (далее БАС), обладающие антибактериальной и антигрибной активностью, получаемые на основе штамма *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Данные соединения предназначены для производства лечебно-профилактических кормовых добавок для введения в рацион сельскохозяйственных животных и птицы с целью профилактики хронических незаразных болезней желудочно-кишечного тракта (далее ЖКТ).

Проблема желудочно-кишечных болезней сельскохозяйственных животных и птицы, вызываемых бактериями, грибами, микотоксинами до сих пор не решена, несмотря на большое разнообразие антибиотиков, пробиотиков, энтеросорбентов, представленных на рынке ветеринарных препаратов.

В настоящее время в связи с появлением инфекций сложной этиологии, обусловленной повышением вирулентности условно-патогенных микроорганизмов, в лечении и профилактике болезней животных возрастает значение фармакопрофилактики. Огромный материальный ущерб, причиняемый животноводческим хозяйствам болезнями, связанными с нарушением пищеварительной системы животных, вынуждает искать пути и методы лечения заболеваний и поискам необходимых терапевтических и профилактических средств.

4.1. Нормативные ссылки

ГОСТ 12.1.004-91. ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.005-88. ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

ГОСТ 12.1.016-79. ССБТ. Воздух рабочей зоны. Требования к методикам измерения концентраций вредных веществ.

ГОСТ 12.1.019-79. ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защит.

ГОСТ 12.2.003-91. ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.

ГОСТ 12.3.002-75. ССБТ. Процессы производственные. Общие требования безопасности.

ГОСТ Р 12.3.047-98. ССБТ. Пожарная безопасность технологических процессов. Методы контроля.

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. Технические условия.

ГОСТ 5833-75 Реактивы. Сахароза. Технические условия.

ГОСТ 4168-79 Реактивы. Натрий азотнокислый. Технические условия.

ГОСТ 2493-75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двухзамещенный. Технические условия.

ГОСТ 4523-77 Реактивы. Магний серноокислый 7-водный. Технические условия.

ГОСТ 4568-95 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия.

ГОСТ 4148-78 Реактивы. Железо сернокислое 7-водное. Технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 8981-78 Эфиры этиловый и нормальный бутиловый уксусной кислоты технические. Технические условия.

ГОСТ 5962-13 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия.

ОСТ 6-01-76-79 Хлорамин Б технический.

ГОСТ 177-88 Водорода перекись.

ГОСТ 975-88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия.

ГОСТ 13805-76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей.

ГОСТ 31674-2012 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.

4.2. Термины, определения, сокращения.

Таблица 14 – Термины, определения, сокращения.

БАС	Биологически-активные соединения
ВР	Стадии вспомогательных работ (подготовка воды, сырья и материалов, приготовление растворов заданной концентрации и т.п.)
КЖ	Культуральная жидкость
Материальный баланс	Сравнение теоретического и полученного выхода готового продукта
МПА	Мясо-пептонный агар
МПБ	Мясо-пептонный бульон
Параметр технологического процесса	норма и/или безопасность, связанные с снижением количества или качества получаемого продукта и/или возникновению аварийных ситуаций
Технологический блок	Аппарат или группа аппаратов, которые могут быть в заданное время отключены (изолированы)
Технологический процесс	Комплекс действий, необходимых для получения готового продукта.
ТП	Стадии основного технологического процесса

УМО	Стадия упаковывания, маркирования и отгрузки готового продукта
-----	--

4.3. Характеристики биологически активных соединений

БАС предназначена для ветеринарной промышленности для производства кормовых добавок, предназначенных для профилактики хронических незаразных болезней сельскохозяйственных животных (заболевания ЖКТ). Основой препарата является комплекс экзометаболитов.

Характеристика продуцента: штамм *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 является телеморфой гриба рода *Hypocrea* семейства *Hypocreaceae* порядка *Hypocreales* отдела *Ascomycota*.

Действующее вещество – биологически активные соединения, обладающие антигрибной и антибактериальной активностью.

Препаративная форма: БАС представляет собой жидкость от бледно-желтого до светло-коричневого густой маслянистой консистенции со специфическим запахом.

Токсичность: данный препарат не является токсичным для людей и животных.

Меры предосторожности: При работе с БАС следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, работа с БАС должна осуществляться в перчатках и маске. При попадании субстанции на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется немедленно промыть большим количеством водопроводной воды. После работы вымыть руки и лицо с мылом.

Хранить в сухом, темном помещении при температуре от 2 до 25 °С. Предохранять от воздействия прямых солнечных лучей. Маркировка должна содержать название, дату выработки и фасовки, номер партии. Срок годности 2 года. Список Б.

4.4. Технологическая схема производства БАС

Предлагаемая технологическая схема производства БАС мицелиальных грибов *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (рисунок 23).

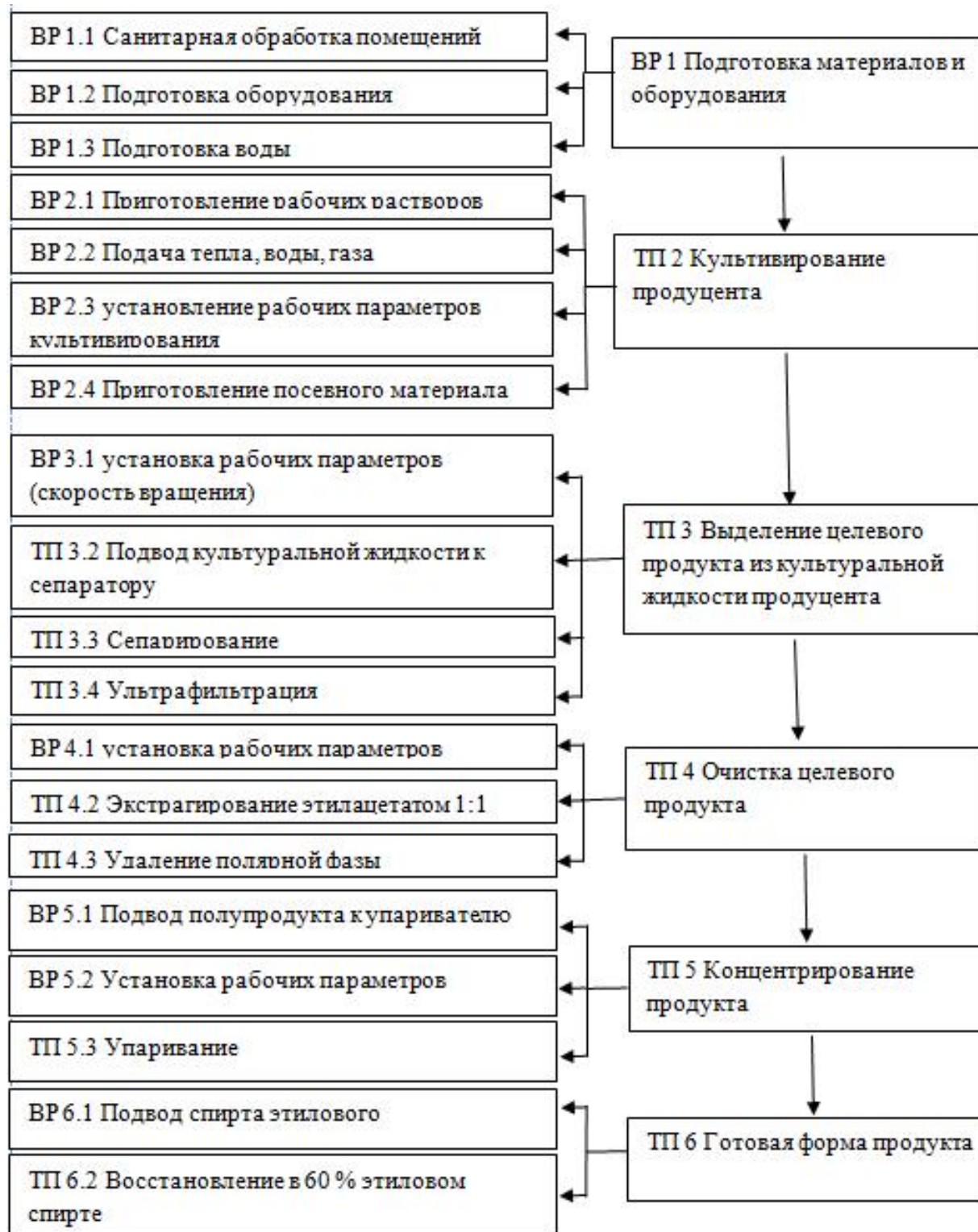


Рисунок 23 – Схема получения экзометаболитов из штамма *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

4.5. Аппаратурная схема производства

Аппаратурная схема производств биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 представлена на рисунке 24.

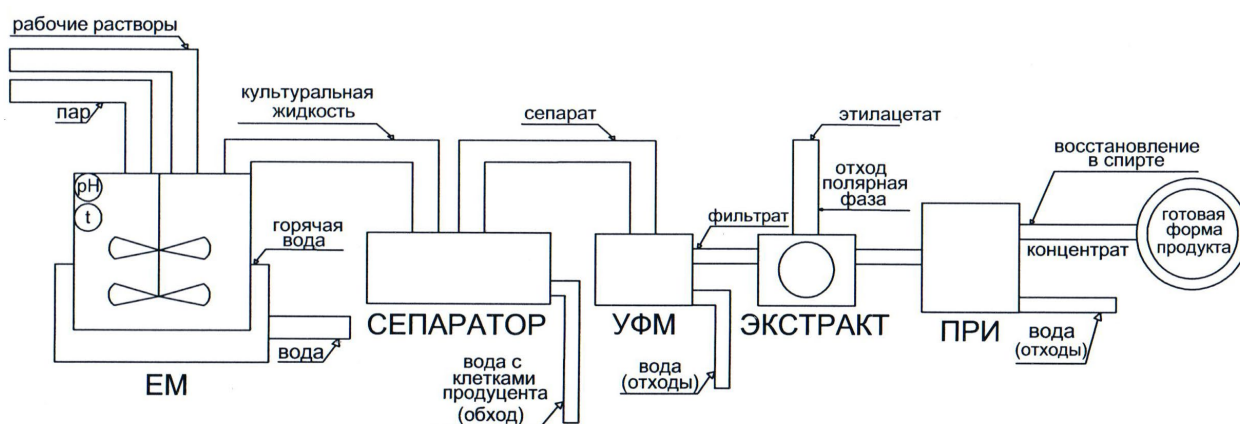


Рисунок 24 – Аппаратурная схема производств биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Спецификация оборудования производства биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 приведена в таблице 15.

Таблица 15 – Спецификация оборудования.

Обозначение	Наименование	Количество	Примечание
ЕМ	Ферментер	1	Подвод тепла, пара, воды, контроль рН, контроль температуры, пробоотборник, перемешивание и его контроль, подача горячего воздуха, загрузка рабочих растворов, отвод культуральной жидкости в сепаратор
	Воздушный центробежный компрессор	1	Для отвода культуральной жидкости из ферментера в сепаратор
СЕП	Сепаратор	1	Разделение суспензионной взвеси, отвод продукта на

			ультрафильтрационные мембраны
УФМ	Ультрафильтрационные мембраны	1	Очистка от клеток продуцента, отвод продукта на экстракционную установку
ЭКСТР	Экстракционная установка	1	Очистка от примесей, отвод продукта на вакуум-выпарную установку
ПРИ	Промышленный роторный испаритель	1	Отвод отхода в виде воды, паста поступает на восстановление этиловым спиртом

4.6. Субстраты и материалы.

Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов приведены в таблице 16; перечень промежуточных продуктов в таблице 17.

Таблица 16 – Показатели сырья и материалов.

Наименование	Сорт или артикул	Показатели, необходимые для проверки	Применение
Основное сырье			
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96	Прозрачность студня, массовая доля общего азота (%), рН раствора агара	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала
Сахароза	ГОСТ 5833-75 ч	Цветность водного раствора	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала
Натрий азотнокислый	ГОСТ 4168-79 ч	Массовая доля натрия азотнокислого, в высушенном препарате, %, не	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала

		менее 99,8	
Калий фосфорнокислый двузамещенный	ГОСТ 2493-75 ч	Массовая доля 3-водного двузамещенного фосфорнокислого калия не менее 98 %	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала
Магний сернокислый 7- водный	ГОСТ 4523-77 ч	Массовая доля 7-водного сернокислого магния не менее 99%	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала
Калий хлористый	ГОСТ 4568-95 ч	Внешний вид, массовая доля калия в пересчете на K_2O не менее 58%, массовая доля воды не более 0,5%, рассыпчатость.	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала
Железо сернокислое 7-водное	ГОСТ 4148-78 ч	Массовая доля 7-водного сернокислого железа 98-101 %.	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72	pH воды 5,4-6,6; массовая концентрация остатка после выпаривания, мг/дм ³ , не более 5	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала, при приготовлении растворов
Этилацетат	ГОСТ 8981-78 ч	Внешний вид, цветность, плотность,	Экстрагирование действующего вещества
Глюкоза кристаллическая гидратная	ГОСТ 975-88	Внешний вид, Прозрачность раствора, светопропускание не менее 80 %, массовая доля влаги не более 9 %.	При изготовлении питательных сред для культивирования посевного материала
Пептон сухой ферментативный для	ГОСТ 13805-	Внешний вид, цвет, запах, pH 6,5-7,0	При изготовлении питательных сред

бактериологических целей	76		для культивирования посевного материала
Вспомогательное сырье и материалы			
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ 5962-13 Ч	Внешний вид, цвет, запах, растворимость	Обеззараживание поверхностей и оборудования
Хлорамин технический Б	ОСТ 6-01-76-79	Массовая доля активного хлора	Приготовление дезинфицирующих растворов
Водорода перекись	ГОСТ 177-88	Массовая доля перекиси водорода 35-40 %	Приготовление дезинфицирующих растворов

Таблица 17 – Перечень промежуточных продуктов, получаемых в производстве биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Наименование промежуточного вещества	Обозначение СТП	Нормативные требования	Стадия, операция	
			Где производится	Где используется
Культуральная жидкость		- Показатель мутности не более 9 мФ - ВЭЖХ	ТП.2	ТП.3.3
Сепарат		Прямой посев на чашки на клетки продуцента	ТП.3.3	ТП.3.4
Фильтрат		Прямой посев на чашки на споры	ТП.3.4	ТП.4.2
Экстракт		ВЭЖХ качественный анализ	ТП.4.2	ТП.5.3
Концентрат		ВЭЖХ количественный анализ для стандартизации готового продукта	ТП.5.3	ТП.6

4.7. Изложение технологического процесса.

Указанные стадии технологического процесса проводились в лабораторных условиях. Технология получения биологически активных соединений из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 представлен блок-схемой на рисунке 1 и состоит из 5 стадий: культивирование продуцента, выделения целевого продукта из культуральной жидкости продуцента, очистки целевого продукта, концентрирования продукта, восстановления до готовой формы.

Указанные стадии технологического процесса проводились в полупроизводственных условиях. В качестве емкостей для проведения культивирования продуцента использовали биореактор (V 100 л).

ВР.1. Подготовка оборудования и материалов

Стадия вспомогательных работ включает в себя санитарную обработку помещений, подготовку оборудования, материалов и воды.

Подготовку воды проводят дистилляцией.

ТП. 2. Культивирование продуцента

Стадия культивирования продуцента включает в себя приготовление рабочих растворов, подача тепла, воды, пара; установление рабочих параметров, приготовление посевного материала.

В емкость 1 (ферментер) вносят NaNO_3 200 г, K_2HPO_4 100 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 50 г, KCl 50 г, FeSO_4 10 г, добавляют 99 литров подготовленной воды стерилизуют 10 минут при температуре 120 °С, давлении 1 атм. (0,1 мПа). Через асептический порт вводят 1 литр стерильного концентрата сахарозы (1500 г/л).

Чистую культуру *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 получают в микробиологической лаборатории. Посев культуры продуцента проводят в пробирки на скошенный агар, выращивают 7 дней при температуре 28 °С. Недельную агаровую культуру суспендируют в изотоническом растворе хлорида натрия, устанавливают мутность 1,5 по стандарту McFarland, вносят

в колбы на 1000 мл с жидкой средой Чапека в соотношении 1:10, инкубируют 5 суток при температуре 28 °С, с перемешиванием.

Подготовленный посевной материал инокулируют через асептический порт в объеме 500 мл (0,5% v/v). Выращивание культуры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 методом одноступенчатого гетерофазного глубинного выращивания в ферментационной установке с усеченным днищем для предотвращения образования застойных зон в питательной среде, содержащей 1,5% сахарозы, 0,2% натрия азотнокислого, 0,1% калия фосфата однозамещенного, 0,05% магния сернокислого гептагидрата, 0,05% калия хлористого, 0,001% железа сернокислого (w/v), при температуре 28 °С, перемешивании (120 мин⁻¹), рН 7,4±0,2, в течение 120 часов до достижения мутности 9 по стандарту McFarland.

Поскольку в ходе культивирования среда склонна к закислению, для поддержания рН на требуемом уровне добавляют 30% раствор NaOH при помощи системы контроля рН в ферментационной установке: рН-электрод, опущенный в среду, рН-метр, блок автоматического титрования, сосуды с кислотой и щелочью, соединенные гибкими шлангами, перистальтические насосы.

ТП. 3. Выделение целевого продукта

Стадия выделения целевого продукта включает в себя установление рабочих параметров скорости вращения, подвод культуральной жидкости к сепаратору, сепарирование, ультрафильтрация.

Для отделения продуцента от культуральной жидкости, ее направляют в сепаратор с частотой вращения 6000 мин⁻¹. Полученный сепарат направляют на ультрафильтрацию через установку мембранного разделения жидких сред трубчатого типа МРТ 200–21К-01.

Отходом в данном технологическом процессе является клеточная масса и споры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

ТП. 4. Очистка целевого продукта

Стадия очистки целевого продукта включает в себя установление рабочих параметров, экстрагирование этилацетатом 1:1, удаление полярной фазы.

Из фильтрационной установки фильтрат культуральной жидкости подают в емкости «ЭКСТР», где его соединяют с равным объемом этилацетата и перемешивают 180 минут. По завершению экстракции перемешивание останавливают, реакционную смесь отстаивают до разделения слоев. Нижний неполярный слой удаляют через слив в днище под контролем зрения. Слив останавливают при прохождении границы фаз через оптический диоптр.

ТП. 5. Концентрирование

Стадия концентрирования включает в себя подвод полупродукта к испарителю, установление рабочих параметров, упаривание.

Отделенный экстракт культуральной жидкости (полупродукт) подают в роторный испаритель. Упаривание проводят при температуре 40 ± 3 °С, с частотой вращения 60 ± 5 мин⁻¹ до полного удаления растворителя.

ТП. 6. Готовая форма продукта

Стадия готовой формы продукта включает в себя восстановление в 60% этаноле.

В ротационный испаритель осуществляют подвод 60% этанола в объеме 500 мл. Устанавливают ротацию с частотой оборотов 30 мин⁻¹ на 15 минут. Полученный продукт переносят в емкость для хранения.

Параметры технологического процесса получения биологически активных соединений представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Параметры технологического процесса

наименование стадии, операции	наименование и позиция аппарата в схеме	наименование элемента операции	Параметры технологического процесса				
			Наименование	значение			
				технологическая норма	Опасное	предел ьно допуст	критическое

		(работы)		мин ·	макс ·		имое	
ТП.2.	ЕМ	ВР.2.3.	t, °С	28 ⁰ С	30°С			
			рН	7,4	7,5			
			обороты	120	130			
			Время, ч	120	144			
			Об/мин	630 0	6500			
	УФМ	ТП.3.4.	Размер пор, мкм	0,05	0,1			
ТП.4.	ЭКСТР	ТП.4.2.	Фактор разделения	700 0				
ТП.5.	ПРИ	ТП.5.3.	T	34° С	36°С			
			обороты	50	60			
ТП.6.	ГП	ТП 6.	% спирта	60 ⁰	65 ⁰			

Параметры режима и безопасности технологического процесса получения биологически активных соединений представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Параметры режима и безопасности технологического процесса получения биологически активных соединений.

Нарушения	Причины нарушений	Возможные способы устранения нарушений
Не обеспечивается поддержание заданного параметра давления в установке	Нарушение в работе перистальтического насоса. Течь.	Проверка целостности шланга (материала трубопровода), шлангов насоса; при необходимости провести их замену; произвести проверку правильности установки и крепления шлангов в перельстатическом насосе
Не обеспечивается перемешивание	Не работает мешалка	Проверить подключение к электросети; заменить мешалку
Неверно	Сбой в работе	Проверить

устанавливается температурный режим	датчика температурного режима	работоспособность датчика температурного режима; замена датчика температурного режима
Падает производительность вакуум-выпарной установки в процессе эксплуатации	Образование накипи на станках трубок испарителя	Периодическая химическая очистка установки каждые 24 часа работы 5% раствором едкого натрия.

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 маслянистого концентрата.

Продукт полностью соответствует требованиям к продуктам для использования в составе кормовых добавок для кормления сельскохозяйственных животных и птицы (Приложение 2,3,4).

Внешний вид – от бледно-желтого до светло-коричневого густой маслянистой консистенции со специфическим запахом.

Массовая доля сухого вещества – 4-5%.

Наличие живых клеток продуцента – клеток нет.

Токсичность – не токсичны.

4.8. Материальный баланс.

Материальный баланс получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Материальный баланс получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Израсходовано		Получено	
наименование сырья и полупродуктов	масса (грамм)	наименование продуктов, отходов и потерь	масса (грамм)
вода подготовленная	100 000	Вода с клетками продуцента после сепарации	53900
Сахароза	1500	Вода после фильтрации	12985

		(рецикл)	
Натрия нитрат	200	Отход после экстрагирования (рецикл)	19658
Калия гидрофосфат	100	Отход после выпаривания (рецикл)	17357,8
Магния сульфат	50	целевой продукт	0,2
Калия хлорид	50		
Железа сульфат	1		
Посевной инокулят	500		
ИТОГО	103901	ИТОГО	103901

Выход биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 составил 0,2 г.

4.9. Контроль производства.

Перечень важнейших контрольных точек получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Перечень важнейших контрольных точек получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Стадии, места отбора проб	Объект	Единицы измерений параметров	Регламентированный параметр
Т.П.2 культивирование продуцента	Культуральная жидкость	Температура, °С	28-30
		рН	7,0
		Показатель мутности	не менее 9 McF
		Обороты	120
	Фильтрат	Прямой посев на чашки Петри	Отсутствие клеток продуцента
		Прямой посев на чашки Петри	Отсутствие спор продуцента
Т.П.4	Экстракт	Фактор разделения	1:1
		ВЭЖХ	Качественный анализ
Т.П.5	Концентрат	Температура	36
		Обороты	50
		ВЭЖХ	Количественный

			анализ
Т.П.6	Готовый продукт	Концентрация спирта	60%

4.10. Методы и средства контроля.

Аппаратура и материалы, применяемые в получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

- рН-метр (рН среды в интервале 1-14 с погрешностью не более 0,1 ед);
- автоклав вертикальный по ГОСТ Р МЭК 61010-2-041;
- микроскоп по ГОСТ 28489-90;
- холодильник по ГОСТ 16317-87;
- термостат (от 20 до 100 °С);
- спиртовка по ГОСТ 25336-82;
- пипетки по ГОСТ 29227-91;
- пробирки по ГОСТ 25336-82;
- воронки по ГОСТ 9147-80;
- бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-76;
- ферментер вертикальный по ГОСТ Р 51738-2001;
- вакуумный насос по ГОСТ Р 52615-2006;
- цилиндры мерные градуированные по ГОСТ 1770-74;
- дозаторы медицинские лабораторные по ГОСТ 28311-89;
- денситометр;
- устройства нагревательные любого типа: электрические, инфракрасные, газовые, снабженные устройствами для регулирования степени нагрева.

Методы контроля, применяемые в получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434:

Посевной материал. 5-дневная чистая культура продуцента – 16 г/л (в пересчете на сухую массу).

Определение рН.

В стандартных условиях производят измерение ЭДС исследуемых растворов с использованием автоматического рН-метра. Значение рН растворов определяют по показаниям прибора.

Определение сухих веществ (СВ) рефрактометрическим методом.

В стандартных условиях производят измерение показателя преломления исследуемого образца. Массовую долю СВ определяют по табличным данным.

Определение показателя мутности – измерение оптической плотности суспензии на денситометре с последующим цифровым представлением результатов в виде единиц Мак-Фарланда.

ВЭЖХ – по стандартной методике, контролем является готовая препаративная форма лабораторного образца биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

4.11. Требования безопасности и промышленной санитарии.

В настоящем разделе приводятся данные об имеющихся опасностях, которые могут привести к пожару, взрыву, а также комплекс технических и организационных мероприятий, обеспечивающих минимальный уровень опасности и оптимальные санитарно-гигиенические работы в помещении для производства кормовых дрожжей.

Все операции производятся в помещениях, отвечающих Санитарным правилам для предприятий дрожжевой промышленности № 2266-80 от 26 ноября 1980 г.

Технологический процесс осуществляется в помещениях 2-го класса чистоты (число частиц размером 0,5 мкм в литре воздуха не более 25), регламентируемый ГОСТ Р 50766-95 «Помещения чистые. Классификация. Методы аттестаций. Основные требования» (1996), ГОСТ Р ИСО 14644-1-2000 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды» (2000 г.).

Режим личной безопасности:

- Правила противопожарного режима в Российской Федерации (утв. Постановление правительства РФ от 25 апреля 2012 года №390;

- Правила по охране труда при эксплуатации электроустановок (с изменениями на 19 февраля 2016 года), утвержденными Министерством труда и социальной защиты РФ от 24 июля 2013 года №328н;

В работе все вредные и опасные факторы были сведены к норме или к минимуму, работа проводилась с соблюдением элементарных правил безопасности:

- электроприборы, как правило, не снабжены от искрения, поэтому нельзя ими пользоваться при работе с легковоспламеняющимися веществами;

- работу проводить только в защитной одежде (халате) в целях предотвращения порчи личной одежды и попадания реактивов на открытые участки тела;

- с агрессивными кислотами и щелочами, а так же с веществами, имеющими резкий запах, работать под тягой с использованием стеклянных или автоматических пипеток с одноразовыми наконечниками;

- при мытье лабораторной посуды и оборудования пользоваться резиновыми перчатками;

- при работе с электроприборами не трогать мокрыми руками токоведущих частей работающих приборов.

4.12. Производственная санитария.

Размеры производственного помещения.

Площадь производственного помещения – 160,0 м², высота потолка – 2,5 м, объем – 40 м³.

В данном помещении одновременно работает не более четырех человек, то есть на каждого приходится 4,0 м² площади и 15,0м³ объема помещения, что соответствует требованиям санитарных правил (площадь 4,5 м² и объем помещения 15 м³).

Метеорологические условия в лаборатории.

Помещение сухое, температура колеблется в пределах 18-22°C, влажность воздуха не превышает 60% оптимальные и допустимые нормы микроклимата лабораторного помещения представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Оптимальные и допустимые нормы микроклимата в рабочей зоне.

сезон года	категория работ	температура, °С		относительная влажность, %		скорость движения воздуха, м/с	
		опт	доп	опт	доп	опт	Доп
холодный	легкая физическая работа	20-30	19-25	60-40	75	0,2	0,2
теплый	легкая физическая работа	22-25	25	60-40	75	0,2	0,2

В лаборатории центральное водяное отопление. Это обеспечивает температуру воздуха в помещении: в холодный период года 21-23°C при относительной влажности воздуха в помещении 60%, в теплый период года 22-24°C при относительной влажности воздуха в помещении 60%.

Согласно данным таблицы 9, микроклиматические условия в лаборатории соответствуют допускаемым санитарным нормам.

Вентиляция.

Обеспечение нормальных метеорологических условий и чистоты воздуха на рабочих местах в значительной степени зависит от правильно организованной системы вентиляции.

В соответствии с нормами в помещении лаборатории предусмотрена естественная вентиляция через дверные и оконные проемы. Естественное движение воздуха в помещении происходит вследствие разности его плотностей вне и внутри помещения (тепловое движение), а также под действием разности давления наружного воздуха с наветренной и

подветренной сторон здания. Естественная вентиляция в лаборатории несет неорганизованный характер. Воздух подается и удаляется из помещения через форточки и окна, открываемые без всякой системы.

Лаборатория оборудована вытяжным шкафом, который вмещает два рабочих места. Скорость всасывания воздуха 1,5 м/с, возможные отклонения – до 1,2 м/с. Это позволяет проводить в вытяжном шкафу работу с вредными веществами всех классов опасности.

Освещение.

В дневное время лаборатория имеет естественное освещение. Норма КЕО (показатель естественного освещения) для бокового освещения составляет 1,5% для средней точности зрительной работы (4 разряд). Площадь световых проемов в лаборатории равна 9 м², что соответствует нормам естественного освещения. Искусственное освещение осуществляется люминесцентными лампами. Количество светильников на данный размер лаборатории – 8 штук, что обеспечивает нормам. В вытяжном шкафу используется люминесцентный свет с лампами в 60 Вт, дающим световой поток в 400 л.м.

Шум.

Уровень шума в лаборатории не превышает 75 ДБ, что соответствует нормам. Источники шума – работающая ферментационная установка, вытяжной шкаф, центрифужная установка.

Водоснабжение.

Система водоснабжения хозяйственно-бытовая. Источник водоснабжения – городской водопровод. Горячая вода поступает через водонагреватель. Очищенная вода через дистиллятор.

Канализация.

В лаборатории имеется хозяйственно-бытовая канализация, снабженная различными гидрозатворами, предназначенными для предотвращения поступления в лабораторию и из нее вредных веществ и

препятствуя распространения пламени в случае пожара. Отработанные жидкости сливаются в канализационную сеть. Дрожжевая вода в канализацию не сливается до очистки. Для предотвращения скапливания летучих токсичных веществ и взрывоопасных веществ системы канализации оборудованы естественной и искусственной вентиляцией.

Отопление.

Лаборатория оснащена радиаторами центрального отопления, которые обеспечивают среднюю температуру воздуха, соответствующую санитарным нормам.

4.13. Техника безопасности.

Электробезопасность.

В лаборатории используется переменный ток напряжением 220 и 380В и частотой 50 Гц. Такие помещения относятся к 1 классу «без повышенной опасности поражения людей электрическим током», так как отсутствуют условия повышенной электроопасности. Оборудование, рассчитанное на то или иное напряжение, имеет надписи. Все рубильники, пусковые устройства и провода изолированы и ограждены.

В соответствии с требованиями ПУЭ для помещений класса В-16 в целях предотвращения травматизма и защиты работающих от поражения электрическим током предусмотрены следующие меры безопасности:

- все силовые машины заземляются;
- все токоведущие элементы электромашин устанавливаются в защищенном месте; осуществляется контроль за изоляцией (два раза в год): сопротивление изоляции проводов на участке между двумя предохранителями должно быть не менее 500 кОм;
- сопротивление заземляющего устройства должно быть не более 4 Ом;
- во избежание электроожогов все пусковые устройства, рубильник, настенные розетки и провода защищаются от непосредственного соприкосновения с частями тела человека.

Пожаробезопасность. Средства пожаротушения. В лаборатории имеются огнетушители, расположенные на видном месте у входа в лабораторию. Проход к ним свободный. Для оповещения о возникшем пожаре в лаборатории имеется телефонная связь. В случае пожара в лаборатории необходимо:

- выключить все приборы;
- вынести из лаборатории все сосуды и емкости с горючими и огнеопасными веществами;
- применить для тушения наиболее эффективные в данном случае средства.

4.14. Технологические затраты на получение биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

В таблице 23 приведены затраты на сырье, материалы и электроэнергию для получения в полупроизводственных условиях получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Таблица 23 - Затраты на сырье, материалы и электроэнергию для получения в полупроизводственных условиях получения биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Наименование материалов (кг, л, шт., кВт-час)	Потребность в материалах	Цена за ед. (кг, л, шт., кВт-час), руб.	Общая стоимость материалов, руб.
Сахароза	1,500	600,000	900,000
Натрий азотнокислый	0,200	119,000	23,800
Калий фосфорнокислый двузамещенный	0,100	520,000	52,000
Магний сернокислый 7-водный	0,050	120,000	1,200
Калий хлористый	0,050	127,000	1,270
Железо сернокислое 7-водное	0,001	2340,000	2,340
Вода дистиллированная	99,000	5,000	495,000
Этилацетат	20,000	102,000	2400,000
Спирт этиловый	0,500	260,000	130,000
Наименование	Потребность в	Цена за ед. (кг,	Общая стоимость

материалов (кг, л, шт., кВт-час)	материалах	л, шт., кВт-час), руб.	материалов, руб.
Затраты на электроэнергию, воду, канализацию			26,900
Итого:			3028,610

Стоимость 0,5 л восстановленных биологически активных соединений штамма *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, который культивировали в ферментационной установке с усеченным днищем в модифицированной питательной среде Чапека с лимитированием по сахарозе, последующим сепарированием, ультрафильтрацией, экстрагированием, высушиванием и восстановлением 60 % этиловым спиртом составляет, составляет 3028,610 руб.

4.15. Технические требования.

Необходимость соответствия препарата правилам, перечислены в таблице 24

Таблица 24 – Характеристики готовых БАС.

Характеристика БАС	Наименование показателя
Внешний вид	Жидкость маслянистой консистенции
Цвет	От бледно-желтого до светло-коричневого
Запах	Специфический запах этилового спирта

Для проверки стерильности препарата делают посев на МПБ, МПА, агар Сабуро и среду Китта- Тароцци (для выявления различных бактерий и грибов). Если рост колоний микроорганизмов на средах отсутствует в течение 10 суток, то препарат считается стерильным.

5. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БИОБЕЗОПАСНОСТИ ЭТИЛАЦЕТАНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНО ЖИДКОСТИ *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 С ЦЕЛЬЮ ОБОСНОВАНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗООТЕХНИИ И ВЕТЕРИНАРИИ.

С помощью качественного суспензионного метода было установлено, что бактериостатические метаболиты (БС) *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 вызывают полную гибель исследуемых штаммов бактерий *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* при всех испытываемых экспозициях (таблица 25).

Таблица 25. Бактериостатическая активность метаболитов (БС) *T. atrobrunneum* F-1434 против тест-штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*

Тест-штамм	Вариант	Экспозиция, мин						
		1	2	3	5	10	15	30
<i>E. coli</i> АТСС 25922	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 11/1	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	+/-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> АТСС 13883	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 24/4	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	+/-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - полное отсутствие роста бактерий; «+» - наличие роста у всех бактерий; «+/-» - наличие роста у некоторых изолятов бактерий

Как следует из данных таблицы, рост стандартных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* в присутствии бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 ингибировался уже на 1-ой минуте экспозиции, клинические изоляты – на 2-ой мин, а в контрольных фиксировался рост бактерий.

Капельный метод определения антимикробной активности бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, что БС ингибируют рост стандартных штаммов бактерий *E. coli* и *K. pneumoniae* в

месте контакта при экспозиции 2 мин., клинических изолятов – 3 мин (таблица 26).

Таблица 26. Бактериостатическая активность метаболитов (БС) *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 против тест-штаммов бактерий *E. coli* и *K. pneumoniae*

Тест-штамм	Вариант	Экспозиция, мин						
		1	2	3	5	10	15	30
<i>E. coli</i> АТСС 25922	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 11/1	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	+/-	+/-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> АТСС 13883	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	+	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 24/4	контроль (без БС)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БС)	+/-	+/-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - полное отсутствие роста бактерий; «+» - наличие роста у всех бактерий; «+/-» - наличие роста у некоторых изолятов бактерий

Использование чашечного (диско-диффузионного) метода определения антимикробной активности бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 по зоне ингибирования роста стандартных штаммов и клинических изолятов исследуемых бактерий, представлены в таблице 27.

Таблица 27. Рост культур тест-штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* под влиянием бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (диско-диффузионный метод)

Культура тест-штамма	Ø зоны подавления роста, мм
<i>Escherichia coli</i> АТСС 25922	26,1±0,12
<i>Escherichia coli</i> 11/1	26,5±0,23
<i>Klebsiella pneumoniae</i> АТСС 13883	21,9±0,21
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 24/4	22,5±0,09

Из данных таблицы следует, что бактериостатические метаболиты *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 проявляют выраженную антибиотическую

активность в отношении как стандартных штаммов, так и клинических изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*. Показатели чувствительности БМ по отношению ко всем представленным тест-объектам находятся практически в одних цифровых пределах (26,1-26,5 мм у *E. coli* и 21,9-22,5 мм у *K. pneumoniae*). Экстракт метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 ингибируют рост исследуемых микроорганизмов при экспозиции 2-3 мин.

6. ПРИМЕНЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ И ГРИБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СОСТАВЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ

Поскольку клинические штаммы бактерий *E. coli* и *K. pneumoniae*, используемые в работе, характеризуются множественной антибиотикорезистентностью, представляло интерес изучить влияние бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в составе композиции с Na-КМЦ, обладающей высокими стабилизирующими свойствами, на их выживаемость.

Готовили 0,5 % (w/v) раствор карбоксиметилцеллюлозы, для чего растворяли сухой КМЦ (ГОСТ 5.588-70) в воде для инъекций (ФС.2.2.0019.15), перемешивали до полного растворения, фильтровали. Основу КМЦ стерилизовали 10 минут автоклавированием при 1 ат., 120 °С, охлаждали до 45 °С, асептически загружали препаратом метаболитов до конечной концентрации 3 % (300 мкл на 10 мл) (v/v), разливали в подготовленные тубы.

Результаты влияния бактериостатических композиций на основе метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 с Na-КМЦ в отношении клинических изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae* представлены в таблица 28.

Таблица 28 – Влияние бактериостатических композиций на основе метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в отношении клинических изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*

Клинические изоляты	Контроль (без АБ и БС)	Концентрация стабилизатора бактериостатической композиции, %			
		0,25	0,5	1,0	2,0
Число колоний					
<i>E. coli</i> 11/1	668±0,98	1,4±0,08	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 24/4	616±0,56	1,7±0,15	-	-	-

Установлено, что бактериостатические композиции на основе метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 при концентрации стабилизатора (Na-КМЦ) от 0,5-2,0% полностью подавляли рост исследуемых клинических изолятов бактерий. В диапазоне концентрации стабилизатора 0,25% происходит снижение антимикробной активности.

При использовании капельного метода определения антимикробной активности бактериостатических композиций на основе метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 с Na-КМЦ, показано, что композиции с 0,5% стабилизатора оказывают бактериостатическое действие на исследуемые стандартные штаммы бактерий *E. coli* и *K. pneumoniae* в месте контакта при экспозиции 1 мин., на клинические изоляты – 2 мин (таблица 29).

Таблица 29. Бактериостатическая активность БСК на основе метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 с Na-КМЦ к тест-штаммам *E. coli* и *K. pneumoniae*

Тест-штамм	Вариант	Экспозиция, мин						
		1	2	3	5	10	15	30
<i>E. coli</i> АТСС 25922	контроль (без БСК)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БСК)	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 11/1	контроль (без БСК)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БСК)	+/-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> АТСС 13883	контроль (без БСК)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БСК)	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 24/4	контроль (без БСК)	+	+	+	+	+	+	+
	опыт (с БСК)	+/-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - полное отсутствие роста бактерий; «+» - наличие роста у всех бактерий

Полученные результаты позволяют судить о высокой антимикробной активности метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в составе бактериостатической композиции с Na-КМЦ в отношении клинических изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*. Сравнение активностей метаболитов, свободных иммобилизованных на биополимере, показало, что действие бактериостатических композиций зависит от концентрации стабилизатора,

что позволило предположить влияние стабилизатора на бактериостатический эффект. Бактериостатическая композиция на основе метаболитов *T. atrobrunneum* F-1434 ингибируют рост исследуемых «проблемных» микроорганизмов при экспозиции 1-2 мин.

В ходе комиссионных испытаний полученная композиция признана микробиологически чистой, безвредной, с умеренной реактогенностью. (Приложение 11) Субстанция метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 не токсична (Приложение 10).

В эксперименте, лабораторным животным скарификатором наносили поверхностные раны, инфицировали равнодолевой смесью стандартных и клинических штаммов *E. coli* ATCC 25922, 11/1; *K. pneumoniae* ATCC 13883, 24/4. На стадии воспаления инфицированные раны начинали обрабатывать БСК-Na-КМЦ и в комбинации с ципрофлоксацином (таблица 30).

Таблица 30. Время персистенции инфекционного агента и заживления инфицированной раны ($X_{cp} \pm \sigma$, сутки).

	Контроль	Ципрофлоксацин	БСК-Na-КМЦ	Ципрофлоксацин + БСК-Na-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-Na-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-Na-КМЦ повышает эффективность антибиотика на 9,3-21,6%.

7. ВЫВОДЫ

1. Определены бактериостатические свойства вторичных метаболитов растений и грибов. Растительные метаболиты обладают более высокой специфичностью в отношении фитопатогенной микрофлоры ($\varnothing > 12$ мм), в то время как метаболиты грибного происхождения дают заметно 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; полифенолы, рутин, антоцианы незначительно увеличивают МИК (25-50%).

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: на 32,4%, 23,4%, 41%, 24,2%. 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) и 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 в условиях «стресса», с лимитированием по углеводному компоненту питательной среды. Установлено, при концентрации сахарозы 15 г/л, что составляет 50% от навески стандартной рецептуры среды Чапека, 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; NaNO_3 2 г/л; K_2HPO_4 1 г/л; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 г/л; KCl 0,5 г/л; FeSO_4 0,01 г/л; посевная доза 0,5% v/v; перемешивание 120 мин^{-1} ; время инкубации 5 сутки; 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 $40 \pm 3^\circ\text{C}$, с частотой вращения $60 \pm 5 \text{ мин}^{-1}$; 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. На лабораторных животных проведена оценка биологической активности и биобезопасности этилацетаного экстракта из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Экстракт метаболитов не токсичен, бактериостатическая композиция на КМЦ-основе признана микробиологически чистой, безвредной, с умеренной реактогенностью. Оптимальное содержание экстракта метаболитов 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%.

Рекомендации

Для увеличения выхода активной фракции метаболитов следует установить физико-химические свойства, структуру и механизм биосинтеза *in vivo*.

Рекомендуется использовать препарат биофлавоноидов, как компонент средств защиты растений от фитопатогенов (ПАТЕНТ 2626174 РФ, бюллетень №21, опубликован 21.07.2017).

Препарат метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 возможно использовать как компонент бактериостатических препаратов «ad usum externum» для животных в концентрации 3% (v/v).

Для лечения кожно-воспалительных процессов предлагается ряд комбинаций БСК-На-КМЦ по стадиям заживления:

воспаление	гипертонический раствор NaCl
экссудация и/или некроз	трипсин/химотрипсин + гидролизный лигнин
регенерация	метилурацил + гидрокортизон + «Рутифлав»

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Алимова Ф. К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф.К.Алимова. – Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2006. – 209 с.
2. Алимова, Ф. К. *Trichoderma* *Hurocrea* (Fungi, Ascomycetes, Hurocreales): таксономия и распространение / Ф. К. Алимова . – Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2005. – 264 с.
3. Анисимова М. М. Фармакогностическое исследование травы гречихи посевной: дисс. ... канд. фарм. наук. – Самара, 2011. – 197 с.
4. Антимикотическая активность грибов порядков Eurotiales и Hurocreales и отбор штамма – продуцента пептаиболов / А. А. Баранова, А.Е. Куварина, В.А. Коршун [и др.]. // Биотехнология: состояние и перспективы развития материалы IX международного конгресса. – М.,2017. – С. 314-315.
5. Антиоксидантная система у пшеницы и гороха в норме и патологии (при апоптозе, некрозе, диагностике)/ Н. Е.Павловская, А. И. Гринблат, А. Ю. Гагарина [и др.]; под общей редакцией Павловской Н.Е.- Орел: ОрелГАУ, 2012.-107 с.
6. Аравийский, А. Н. Первые итоги применения гордецина в дерматологической практике / А. Н. Аравийский, Е. В. Нечаева, С. А. Крастелевская // Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства: сб. ст. – Киев, 1967. - С. 272 – 274.
7. Баробой, В. А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Баробой. - М.: Наука, 1984. - 160 с.
8. Буров, В.Н. Биологически активные вещества в защите растений/ В.Н. Буров, А.П. Сазонов - М.: ВО "Агропромиздат". – 1987. – 200 с.
9. Вешняков В. А., Хабаров Ю. Г., Камакина Н. Д. Сравнение методов определения редуцирующих веществ: метод Бертрана,

- эбулиостатический и фотометрический методы / В.А. Вешняков, Ю.Г. Хабаров, Н.Д. Камакина // Химия растительного сырья. 2008. №4. С. 47–50.
10. Высочина, Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных / Г.И. Высочина. – Новосибирск: Наука, 2004. – 240 с.
11. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 144 с.
12. Гнеушева И. А. Биотехнологическая переработка отходов производства гречихи и получение ценных продуктов: дисс. ... канд. тех. наук. – Воронеж, – 2014. – 143 с.
13. Гнеушева И.А. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, И.В. Яковлева // Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2010. - № 3. - С. 36-38.
14. Горленко, М.В. Все о грибах / М.В. Горленко, Л.В. Гарибова, И.М. Сидорова [и др.]. – Москва: Лесная промышленность, 1985. - 280 с.
15. Горькова И.В. «Динамика накопления флавоноидов в онтогенезе гречихи и биохимические изменения семян в процессе хранения»: автореф. дисс...канд. с.-х.н. -Орел, 2002.
16. Ежов, И. С. Биохимическое исследование процесса замачивания зерна при солодоращении и пути его совершенствования: автореф. дисс ... канд. техн. наук / Ежов Игорь Сергеевич; Ленинградский технологический ин-т пищевой пром-ти. – Л., 1954. - 17 с.: ил. – Библиогр.: С. 17
17. Ежов, И. С. Новый антибиотик гордецин и пути его использования в народном хозяйстве: автореф. дисс. ... д-ра техн. наук / Ежов И.С.;

- Ленинградский технологический институт пищевой пром-ти. - Л., 1968.- 49 с. : ил. – Библиогр.: С. 49.
18. Жученко Е.В. Влияние эфирных масел на микроорганизмы различной таксономической принадлежности в сравнении с современными антибиотиками. Сообщение III: Действие масел лаванды, розового дерева, эвкалипта, пихты на некоторые грамотрицательные бактерии/ Е. В. Жученко, Е.Ф. Семенова, Н.Н. Маркелова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки». - 2015. – № 1 (9). – С. 31-42.
19. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях/ М.Н.Запрометов - М.: Наука. – 1993. – 272с.
20. Зелепуха, С. И. Антимикробные свойства растений, употребляемых в пищу. / С.И. Зелепуха. - Киев : Наукова думка, 1973. – 334 с.
21. Ковтун, Г.А. Реакционная способность взаимодействия фенольных антиоксидантов с пероксильными радикалами / Г.А. Ковтун // Катализ и нефтехимия. – 2000. – №4. – С. 1-9
22. Коломбет Л.В. Грибы рода *Trichoderma* - продуценты биопрепаратов для растениеводства / Л. В. Коломбет // Успехи медицинской микологии. - М., 2007. - С. 323-371.
23. Коршиков, Б.М. Лекарственные свойства сельскохозяйственных растений / Б. М. Коршиков, Г. В. Макарова, Н. Л. Налетько [и др.]. - Минск: Урожай, 1985. - 272 с.
24. Костромичева Е.В. Выделение гордецина из зерна ячменя и исследование его биологического действия и взаимосвязи с морфофизиологическими признаками: дисс. ... канд. биол. наук. – Воронеж, 2013. – 152 с

25. Крикова, А.В. Биологическая активность растительных источников флавоноидов / А.В. Крикова, Р.С. Давыдов, Ю.Н. Мокин [и др.]. // Фармация. - 2006. - Т. 54. - №3. - С. 17-18.
26. Крыжановская, Е. В. Биологически активные вещества в ветеринарии: дисс. ... д-ра биолог. Наук /Е. В. Крыжановская. –Кашинцево, 2008. - 132 с.
27. Крюков С.В. Мероприятия по обеспечению биологической безопасности и ветеринарного благополучия по опасным инфекционным заболеваниям сельскохозяйственных животных. /С. В. Крюков, Н. В. Мельник, П. П. Рахманин [и др.]. - Электрон. дан. - Режим доступа: http://pticainfo.ru/article/?ELEMENT_ID=7109, свободный.
28. Куварина А. Е. Микромицеты (отдел Ascomycota порядка Eurotiales и Нуросcreales) с антигрибной активностью и отбор продуцента антибиотиков-пептаибиолов: автореф. дисс.... канд. биол. наук – Москва, 2016.-26 с.
29. Куварина А. Е. Нерибосомальные пептиды грибов: биологическая активность и их перспективы в медицине/ А.Е. Куварина, А.В. Кураков, В.С. Садыкова [и др.]. // Проблемы медицинской микологии - 2016. -Том 18. - №3. - С. 36-41
30. Лукнер, М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных / М. М. Лукнер - Мир. – 1979. – 548 с.
31. Маркелова Н. Н. Полиантибиотикорезистентность некоторых грамотрицательных бактерий и возможн[39]ости её преодоления с помощью эфирных масел: дисс. ... канд. биол. наук. – Пенза, 2016. – 214 с.
32. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилене, Х.Б.Ленцнер [и др.]. // Лабораторное дело. - 1986. - №4. - С.210-212.

33. Методические рекомендации по оценке устойчивости генотипов гороха к возбудителям фузариоза и аскохитоза с помощью биохимических тестов. / Н. Е. Павловская, О. А. Шалимова, Е. Ф. Азарова [и др.]. - Орел, 2002 – 21 с.
34. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.— 67 с.
35. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания
36. Новотельнов Н.В., К вопросу о химической природе антибиотика гордецин / Н.В. Новотельнов, И.С. Ежов // Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства: сб. ст. – Киев, 1967. - С. 146 – 150
37. Новотельнов, Н. В. Влияние фенольных соединений ячменного зерна на накопление дрожжевой биомассы/ Н. В. Новотельнов, И. М. Фаицкая // Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства: сб. ст. – Киев, 1967. - С. 115–117.
38. Новотельнов, Н. В., Влияние антибиотика типа гордецина на продуцирование амилазы плесневым грибом *Aspergillus oryzae* / Н. В. Новотельнов, И.С. Ежов, К. К. Горбатова // Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства: сб. ст. – Киев, 1967. - С. 150–152.
39. Новотельнов, Н.В., Ежов И.С. Новый антибиотик гордецин, выделенный из ячменного зерна/ Н.В. Новотельнов, И.С.Ежов // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. - 1959. - №3. - С. 178-182
40. Озерецковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений / О.Л. Озерецковская // Аграрная Россия. - 1999. - № 1.- С.4-9.

- 41.Октябрьский О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова // Биохимия. - 2007. - Т. 72. - С. 158-174.
- 42.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
- 43.Павловская Н.Е. Гордецин – новое биологическое средство защиты растений от возбудителей болезней / Н.Е. Павловская, Е.В. Костромичева // Всероссийская научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» - Иркутск. – 2018. – С 604-607.
- 44.Племенков, В.В. Введение в химию природных соединений / В.В. Племенков - Казань. – 2001. – С.178-182.
- 45.Садыкова В.С. Антимикробная активность грибов рода *Trichoderma* в отношении условно-патогенных микроорганизмов / В.С. Садыкова, Н. М. Чижмотря, Г.К. Ковалева // 5 Всероссийский конгресс по медицинской микологии «Успехи медицинской микологии». Т. IX. – М., 2007.- С.187 – 189.
- 46.Самойлова З. Ю. Изучение антиоксидантного действия растительных экстрактов на бактерии *Escherichia coli* : дисс. ... канд. биолог. наук / З. Ю.Самойлова - Пермь, 2009.- 159 с
- 47.Семенов, А.А. Очерк химии природных соединений / А.А Семенов - Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН. – 2000. – С. 601-603.
- 48.Солохина, И. Ю. Выделение авенацина из овса посевного (*Avena sativa* L.) и изучение его физиолого-биохимических аспектов действия: дис. ... канд. биолог. наук / И. Ю. Солохина - Воронеж, 2013.- 133 с.

- 49.Тарчевский И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие/ И.А. Тарчевский // Физиология растений.-2000.-том 47.-№2.- С.321-328
- 50.Токарев С.В. Токсигенный потенциал *Fusarium roae* из зерна в Европейской части России / С.В. Токарев, Н.А. Соболева // Материалы I съезда ветеринарных фармакологов России, Воронеж. – 2007. - с. 586-590.
- 51.Токин Б.П. В книге: «Фитонциды, их биологическая роль, значение для медицины и народного хозяйства». Киев: Наукова думка, 1967. – С. 8.
- 52.Феофилова, Е. П. Мицелиальные грибы как источники получения новых лекарственных препаратов с иммуномодулирующей, противоопухолевой и ранозаживляющей активностями / Е. П. Феофилова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – № 1. – с. 27–33.
- 53.Физиология растений. / Н. Д. Алехина, Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко [и др.]. - М.: Изд. центр «Академия». – 2007.– С.456-458.
- 54.Черемушкина И.В. Оптимизация условий биосинтеза β -маннаназы грибного происхождения / И.В. Черемушкина, Н.А. Некрасова, С. Н. Черняева [и др.]. // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. - 2013. - №2 (56) - С. 206-209.
- 55.Чесноков Ю.В. Устойчивость растений к патогенам (обзор иностранной литературы) / Ю.В. Чесноков //Сельскохозяйственная биология. – 2007- №1. – С.16-35.
- 56.Четвериков С.П. Идентификация новых экзометаболитов некоторых штаммов *Pseudomonas spp.* и технология биопрепаратов на их основе: дисс. ... д-ра биолог. наук /С.П. Четвериков - Уфа, 2012.
- 57.Чижов Г. Б., Применение гордецина для увеличения стойкости яиц при хранении / Г. Б. Чижов, Р. А. Диденко, И. М. Биккулова [и др.]. //

- Фитонциды, их биологическая роль и значение для медицины и народного хозяйства: сб. ст. – Киев, 1967. – С. 351–353.
58. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. Под. ред. академика АН БССР А. С. Вечера. Изд. 2-е перераб. и доп. - Минск, "Вышэйшая школа", 1976. - 288 с., ил.
59. Штерниш М.В. Грибные препараты / М. В. Штерниш, Ф. С. Джалилов, И. В. Андреева // Биологическая защита растений. - М: Колос, 2004. – С. 195-198.
60. Яковлев, Г.П. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения / Фармакогнозия: учебное пособие / Г.П. Яковлев; под ред. Г.П. Яковлева. - СПб.: Спецлит. – 2006. – С. 298-303.
61. Adams, M.D., Nickel, G.C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A.R., Jacobs, M.R., et al. (2009) Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 3628-3634
62. Akagawa M. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions / M. Akagawa, T. Shigemitsu, K. Suyama // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003. - V. 67. - P. 2632-2640
63. Alonso, A. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance / A. Alonso, P. Sanchez, J. L. Martínez // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2000. – V. 44. – № 7. – P. 1778-1782.
64. Aly, A.H. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products / A.H. Aly, Debbab A., Kjer J. et. al // *Fungal Divers.* – 2010. – V. 41. – P. 1–16.
65. Aminov, R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes / R.I. Aminov, Mackie R.I. // *FEMS Microbiol Lett.* – 2007. - V. 271. – P. 147–161

66. Anand S, Reddy J: Biocontrol potential of *Trichoderma* spp. against plant pathogens. // *Int J Agric Sci* 2009;1:30-39
67. Anson, M.L. (1938) The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain, and Cathepsin with Haemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22, 79-89.
68. Avis TY, Hamelin RC, Belanger RR: Approaches to molecular characterization of fungal biocontrol agents: some case studies. *Can J Plant Pathol* 2001;23:8-12
69. Avison, M. B. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β -lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia* / M. B. Avison, C. S. Higgins, C. J. von Heldreich // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2001. – V. 45. – № 2. – P. 413-419
70. Balandrin, M., Kloke, J., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H. Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal materials / M. Balandrin, J. Kloke, E.S. Wurtele, W.H. Bollinger // *Science*. – 1985. – V. 228. – P. 1154-1160.
71. Bamford, V., Kolade, O., Osbourn, A., Hemmings, A. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a fungal saponin-detoxifying enzyme / V. Bamford, O. Kolade, A. Osbourn, A. Hemmings, // *Acta Crystallographica D* 60. – 2004. – P. 1331-1333.
72. Bednarek, P. and Osbourn, A. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense / P. Bednarek and A. Osbourn // *Science* 324. – 2009. – P. 746-748.
73. Beers Jr, R.F. and Sizer, I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 133.
74. Benítez T. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains / T. Benítez, AM. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón // *International Microbiology*. – 2004. – № 7. – P. 249-260.

75. Benítez T. Glucanolytic and other enzymes and their genes / T. Benítez, C. Limón, J. Delgado-Jarana, M. Rey // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. – London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 101-127.
76. Benítez, AM. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón // *International Microbiology*. – 2004. – № 7. – P. 249-260.
77. Bonnin, R. A. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii* / R. A. Bonnin, P. Nordmann, A. Potron // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – V. 55. – № 1. – P. 349-354
78. Bonomo, R. A., Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa* // *Clinical Infectious Diseases*. – 2006. – V. 43. – Suppl. 2. – P. 4956
79. Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
80. Bradford, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat *Clinical microbiology reviews*. – 2001. – V. 14. – № 4. – P. 933-951.
81. Brooke, J. S. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2014. – V. 12. – № 1. – P. 1-4.
82. Brotman Y. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. / A. Viterbo, A Wiest, Y Brotman, I Chet, C Kenerley // *Molecular plant pathology* - 2007. - V. 8. - P. 737-746
83. Brotman Y., Briff E., Viterbo A., Chet I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. // *Plant Physiol.*, 2008. Vol. 147, pp. 779-789.

84. Burkhardt, H. J., Maizel, J. V., Mitchell, H. K. Avenacin, an Antimicrobial Substance Isolated from *Avena sativa*. II. Structure / H. J. Burkhardt, H. K. Mitchell, J.V. Maizel // *Biochemistry*. – 1963. – 3 (3). – P.426-431.
85. Calvo, A. M. Relationship between secondary metabolism and fungal development / A. M. Calvo, R.A. Wilson, J.W. Bok, N.P. Keller // *Microbiol. and Molec. Biol. Rev.* - 2002. – V. 66. – № 9. – P. 447- 459.
86. Chu, H.Y., Osbourn, A., Wegel, E. From hormones to secondary metabolism: the emergence of secondary metabolic gene clusters in plants / H.Y. Chu, A. Osbourn, E. Wegel // *Plant Journal*. – 2011. – V. 66. – P. 66-79.
87. Corvec, S. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains / S. Corvec, N. Caroff, E. Espaze // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2003. – V. 52. – № 4. – P. 629-635
88. Coyne, S. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. / S. Coyne, P. Courvalin, B. Périchon // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – V. 55. – № 3 – P. 947-953.
89. Craven, G.R., Steers, E., Jr. and Anfinsen, C.B. (1965) Purification, composition and molecular weight of the beta-Galactosidase of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 240, 2468-2477
90. Crombie, W.M., Crombie, L. Distribution of Avenacins A-1, A-2, B-1, B-2 in oat roots: Their fungicidal activity towards take-all disease./ W.M. Crombie, L. Crombie // *Phytochemistry*. – 1986. – V. 25. – P. 2069-2073.
91. Degenkolb T., Gräfenhan T., Berg A., Nirenberg H.I., Gams W., Brückner H. Peptaibiotics: screening for polypeptide antibiotics (Peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chem Biodivers* 2006; 3: 593-610
92. Degenkolb, T. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions / T. Degenkolb, Berg A., Gams W. et. al // *J. Pept. Sci.* - 2003. – V. 9. – P. 666-678.

93. Dickanaité E¹, Nemeikaitė A, Kalvelytė A, Cėnas N. Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. / *Biochem Mol Biol Int.* 1998 Aug;45(5):923-30.
94. Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. 2011. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nature Rev. Microbiol.* 9 (10): 749–759
95. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analyt. Chem.* 1956. V. 28. P. 350-356
96. Durner J., Shah J., Klessig D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. / *Trends Plant Sci.*, 1997, 2: 266-274.
97. Einhellig, F.A. Effect of allelopathic chemicals on crop productivity / F.A. Einhellig // *ACS Symposium Series.* Washington: D.C., – 1985. – P.-108-121.
98. Galati G. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics / G. Galati, O. Sabzevari, J.X. Wilson, P.J. O'Brien // *Toxicology.* 2002. - V. 177. - P. 91-104.
99. Gams, W. Biodiversity of Fungi: Standard Methods for Inventory and Monitoring? / W. Gams, Diederich P., Poldmaa K. - New York: Academic Press, 2004. – 343 p.
100. García-León, G. A function of SmeDEF, the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*, is the colonization of plant roots / G. García-León, A. Hernández, S. Hernando-Amado // *Applied and environmental microbiology.* – 2014. – V. 80. – № 15. – P. 4559-4565
101. Glasebrook J., Rogers E.E., Ausubel P.M. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defence responses. *Ann. Rev. Genet.*, 1997b, 31: 569-570

102. Gomez I. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates / I. Gomez, I. Chet, A. Herreraestrela // *Molecular and General Genetics*. – 1997. – Vol. 256. – P. 127-135
103. Gornall, A.G., Bardavill, C.J., David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
104. Granado-Serrano A.B. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in human hepatoma cell line pG2) / A.B. Granado-Serrano, M.A. Martin, L. Bravo, L. Goya, S. Ramos // *The Journal of nutrition*. - 2006 - Volume: 136. - P. 2715-2721
105. Guilleroux, M., Osbourn ,A. Gene expression during infection of wheat roots by the "take-all" fungus *Gaeumannomyces graminis* / M. Guilleroux, A. Osbourn// *Molecular Plant Pathology* 5. – 2004. – P. 203-216.
106. Hammerschmidt R. Phytoalexins: what have we learned after 10 years? *Ann. Rev. of Phytopathol.*, 1999, 37: 285-306
107. Han X. Dietary polyphenols and their biological significance / X. Han, T. Shen, H. Lou//*Int. J. Mol. Sci.* 2007. - V. 8. - P. 950-988,
108. Hanson J.R.. *The chemistry of fungi*. Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry 2008
109. Harman G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96 (2): 190–194.
110. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (1): 43–56
111. Hentschke, M. ramR mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline / M. Hentschke, M. Wolters, I. Sobottka // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – № 6. – P. 2720-2723

112. Hood, M. I. Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii* / M. I. Hood, K. W. Becker, C. M. Roux // *Infection and immunity*. – 2013. – V. 81. – № 2. – P. 542-551
113. Mini-PROTEAN® Tetra Cell [Электронный ресурс] / Instruction Manual. – Электрон. текст. дан. – Bio-Rad Laboratories, Inc. – Режим доступа: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>, свободный.
114. Устойчивость к антибиотикам – серьезная угроза общественному здравоохранению [Электронный ресурс] / Доклад ВОЗ. – Электрон. текст. дан. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/ru/>, свободный.
115. Bradford reagent [Электронный ресурс] / Technical bulletin. – Электрон. текст. дан. – Sigma-Aldrich, Inc. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/b6916bul.pdf>, свободный.
116. Total protein reagent [Электронный ресурс] / Technical bulletin. – Электрон. текст. дан. – Sigma-Aldrich, Inc. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/t1949bul.pdf>, свободный.
117. Enzymatic assay of b-galactosidase [Электронный ресурс] / Technical bulletin. – Электрон. текст. дан. – Sigma-Aldrich, Inc. – Режим доступа: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/bgalactosidase72.pdf, свободный.
118. Protein determination Lowry method [Электронный ресурс] / Technical bulletin. – Электрон. текст. дан. – Sigma-Aldrich, Inc. – Режим доступа: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/2/lowry.pdf, свободный

119. Enzymatic assay of catalase [Электронный ресурс] / Technical bulletin. – Электрон. текст. дан. – Sigma-Aldrich, Inc. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-catalase.html>, свободный.
120. Enzymatic assay of superoxide dismutase [Электронный ресурс] / Technical bulletin. – Электрон. текст. дан. – Sigma-Aldrich, Inc. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-superoxide-dismutase.html>, свободный.
121. Jacoby, G. A. AmpC β -lactamases // Clinical microbiology reviews. – 2009. – V. 22. – № 1. – P. 161-182.
122. Jacoby, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones // Clinical Infectious Diseases. – 2005. – V. 41. – Suppl. 2. – P. 120-126
123. Jacoby, G. A., Munoz-Price L. S. The new β -lactamases // New England Journal of Medicine. – 2005. – V. 352. – № 4. – P. 380-391
124. Kajiya K. Role of lipophilicity and hydrogen peroxide formation in cytotoxicity of flavonols / K. Kajiya, M. Ichiba, M. Kuwabara, S. Kumazawa, T. Nakuyama//Biosci. Biotechnol. Biochem. -2001. V. 65. - P. 1227-1229.
125. Kefeli VI, Kalavitch MV, Borsari B. Phenolic cycle in plants and environment. Gournal of Cell and Molecular Biology.- 2003. 2: 13-18.
126. Kessler M. Anti- and prooxidant activity of rutin and quercetin derivatives / M. Kessler, G. Ubeaud, L. Jing//J. Pharm. Pharmacol. 2003. - V. 55. - P. 131-142.
127. Kirk, P.M. Dictionary of the Fungi / P.M. Kirk, Cannon P.F., Minter D.W. et. al – Wallingford: CABI International, 2008. – 784 p.
128. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. //Nature 1970, v. 227,pp. 680-685.

129. Lee-Hilz Y.Y. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression / Y.Y. Lee-Hilz, A. Boerboom, A. Westphal, W.J.H. van Berkel//Chem. Res. Toxicol. 2006. - V. 19. - P. 1499-1505.
130. Li, X-Z. Role of the acetyltransferase AAC (6')-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* / X-Z. Li, L. Zhang, G. A. McKay // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – V. 51. – № 4. – P. 803-811
131. Lowry O. , Rosebrough N. , Farr A. , Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. // J.Biol.Chem. 1951. 193, 265-270. J.Biol.Chem. 1951
132. Lu C. Quantitative and kinetic study of oxidative stress regulons using green fluorescent protein / C. Lu, C.R. Albano, W.E. Bentley, G. Rao//Biotechnol. Bioeng. -2005. V. 89.-P. 574-587
133. Mansfield J.W. Antimicrobial compounds and resistance, the role of phytoalexins and phytoanticipins. In: Mechanisms of Resistance to Plant Diseases /Eds. A.J. Slusarenko, R.S.S./Fraser, L.C. Van Loon. Dordrecht, 2000: 325-370
134. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). J.Biol.Chem. 244, 6049-6055 (1969)
135. Miriagou. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues / V. Miriagou, G. Cornaglia, M. Edelstein // Clinical microbiology and infection. – 2010. – V. 16. – Iss. 2. – P. 112-122
136. Moland, E. S. Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 US hospitals / E. S. Moland, J. A. Black, J. Ourada // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – V. 46. – № 12. – P. 3837-3842.

137. Motohashi N. Functionality of anthocyanins as alternative medicine / N. Motohashi, H. Sakagami//Top. Heterocycl. Chem. 2008. - V. 15. - P. 1-48.
138. Nakagawa, H.; Hasumi, K.; Woo, J.T.; Nagai, K.; Wachi, M. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis* 2004, 25, 1567–1574.
139. Nielsen, L. E. IS5 element integration, a novel mechanism for rapid in vivo emergence of tigecycline nonsusceptibility in *Klebsiella pneumoniae* / L. E. Nielsen, E. C. Snesrud, F. Onmus-Leone // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – V. 58. – № 10. – P. 6151-6156.
140. Nikaido, H., Pagès J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria // *FEMS microbiology reviews*. – 2012. – V. 36. – Iss. 2. – P. 340-363
141. Okazaki, A., Avison M. B. Aph (3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*// *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007 – V. 51. – № 1. – P. 359-360
142. Oleszek, W.A., Hoagland, R.E. and Zablotowicz, R.M. Ecological significance of saponins / W.A. Oleszek, R.E. Hoagland and R.M. Zablotowicz //In: Inderjit, K.M.M.Dakshini, and C.L.Foy, ed. *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemical Interactions*. Boca Raton: CRC Press. – 1999. – P. 451-465.
143. Osbourn, A. Gene clusters for secondary metabolic pathways: An emerging theme in plant biology/ A. Osbourn // *Plant Physiology*. – 2010. – V. 154. – P. 532-535.
144. Osbourn, A. Secondary metabolomics gene elusters, evolutionary took its for chemical innovation/|*Trends in Genltics*.- 2010, 26, 449-457 p.

145. Osbourn, A., Qi, X., Townsend, B. Secondary metabolism and plant defence / A. Osbourn, X. Qi, B. Townsend // *New Phytologist* 159. – 2003. – P.101-108.
146. Pai, H. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* / H. Pai, C. Kang, J-H. Byeon // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2004. – V. 48. – № 10. – P. 3720-3728.
147. Perez, F. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / F. Perez, A. M. Hujer, K. M. Hujer // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – V. 51. – № 10. – P. 3471-3484
148. Pitout, J. D. D. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community / J. D. D. Pitout, P. Nordmann, K. B. Laupland // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2005. – V. 56. – № 1. – P. 52-59.
149. Poirel, L. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods / L. Poirel, R. A. Bonnin, P. Nordmann // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2012. – V. 12. – № 5. – P. 883-893.
150. Prashanth, K., Badrinath S. Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status // *Journal of medical microbiology*. – 2000. – V. 49. – № 9. – P. 773-778.
151. Pucci, M. J., Bush K. Investigational antimicrobial agents of 2013 // *Clinical microbiology reviews*. – 2013. – V. 26. – № 4. – P. 792-821; Thomas-Virnig, C. L. Inhibition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by nonviral expression of hCAP-18 in a bioengineered human skin tissue / C. L. Thomas-Virnig, J. M. Centanni, C. E. Johnston // *Molecular Therapy*. – 2009. – V. 17. – № 3. – P. 562-569.

152. Reino J.L., Guerrero R.F., Hernández-Galán R., Collado I.G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* 2008; 7: 89-123
153. Reithner B. Tmk1, a *Trichoderma atroviride* MAP-kinase, and its role in the mycoparasitic response / B. Reithner, R. Schuhmacher, S. Zeilinger // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.
154. Rietjens I.M.C.M. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids / I.M.C.M. Rietjens, M.G. Boersma, L. de Haan, B. Spenkeliink, H.M. Awad, N.H.P. Cnubben, J.J. van Zanden, H. van der Woude, G.M. Alink, J.H. Koeman // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* - 2002. - V. 11. - P. 321-333.
155. Roca, I. First identification and characterization of an AdeABC-like efflux pump in *Acinetobacter* genomospecies 13TU / I. Roca, P. Espinal, S. Martí // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 2011. – V. 55. – № 3. – P. 1285-1286.
156. Rocha, P. Chaverri & W. Jaklitsch, 2015 in National Center for Biotechnology Information (NCBI). NCBI Taxonomy. Checklist Dataset <https://doi.org/10.15468/rhydar> accessed via GBIF.org on 2017-12-26
157. Rodríguez-Martínez, J. M. Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii* / J. M. Rodríguez-Martínez, P. Nordmann, E. Ronco // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 2010. – V. 54. – № 8. – P. 3484-3488.
158. Ruiz, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2003. – V. 51. – № 5. – P. 1109-1117.
159. Rumbo, C. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* / C.

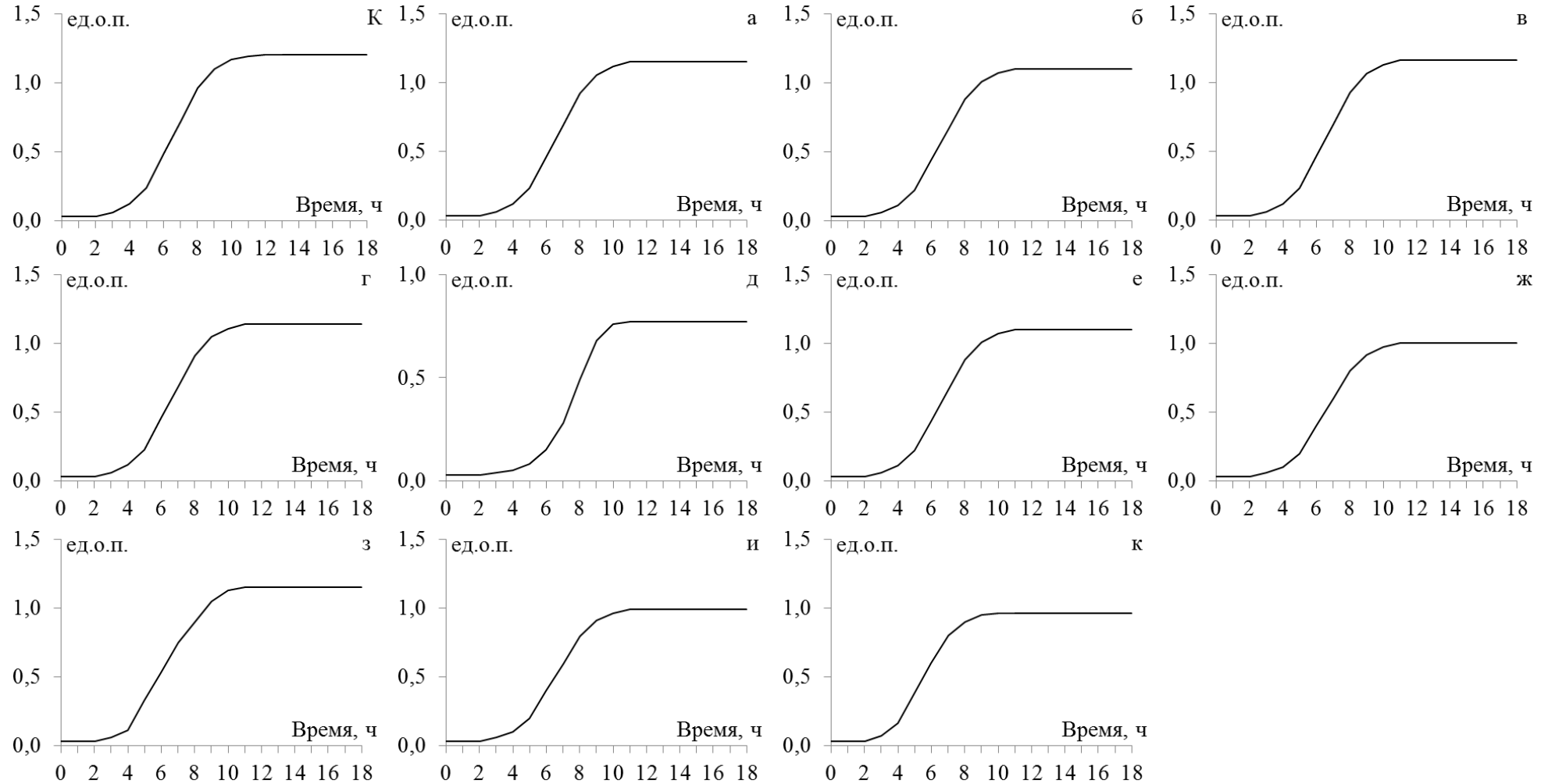
- Rumbo, M. López, C. Ruiz de Alegría // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – V. 57. – № 11. – P. 5247-5257.
160. Rushton P.J., Somssich I.E. Transcriptional control of pknt genes responsive to pathogens Curr. Opin. PlantBiol., 1998, 1: 311-315.
161. Sakihama Y. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants / Y. Salihama, M.F. Cohen, S.C. Grace, H. Yamasaki//Toxicology. 2002. -V. 177. - P. 67-80
162. Sato, K. I. Ihibition of tumor angiogenesis and metastasis by saponin of Panax ginseng, ginsenoside-Rb2 / K.Sato, M. Mochizuki, I. Saiki , Y.C.Yoo, K. S amukawa, I. Azuma // Biol. Pharm. Bull. 1994. – V. 17. – P. 635-639,
163. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases /Crit Rev Food Sci Nutr. 2005;45(4):287-306.
164. Sesma, A., Osbourn, A. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi / A. Sesma, A. Osbourn // Nature 431. – 2004. – P. 582-586.
165. Sharma V. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress /V. Sharma, C. Joseph, S. Ghosh, A. Agarwal, M. Kumar-Mishra, E. Sen //Mol. Cancer Ther. 2007. - V. 6. - P. 2544-2553.
166. Souli, M. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe / M. Souli, I. Galani, H. Giamarellou // Euro surveill. – 2008. – V. 13. – Iss. 47. – P. 584-594).
167. Stoppacher, N. The Comprehensive Peptaibiotics Database / N. Stoppacher, Brückner H., Burgstaller L. et. al // Chemistry & Biodiversity. – 2013. – V. 10, T. 5. – P. 734-743

168. Strateva, T. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance / T. Strateva, D. Yordanov // *Journal of medical microbiology*. – 2009. – V. 58. – № 9. – P. 1133-1148.
169. Strunz, G.M., Finlay, H. Concise, efficient new synthesis of Pipericide, an insecticidal unsaturated amide from *Piper nigrum* and related compounds / G.M. Strunz, H. Finlay // *Tetrahedron*. – 1994. – V. 50. – № 38. – P. 11113-11122.
170. Sun, Y. The emergence of clinical resistance to tigecycline / Y. Sun, Y. Cai, X. Liu // *International journal of antimicrobial agents*. – 2013. – V. 41. – Iss. 2. – P. 110-116
171. Tada, T. Identification of a Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC (6')-Iak, from a Multidrug-Resistant Clinical Isolate of *Stenotrophomonas maltophilia* / T. Tada, T. Miyoshi-Akiyama, R. K. Dahal // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – V. 58. – № 10. – P. 6324-6327.
172. Theis, N., Lerda, M. The evolution of function in plant secondary metabolites / N. Theis, M. Lerda // *Plant Sci.*: 2003. – V.3. – P. 93-102.
173. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. C Nicolás, R Hermosa, B Rubio, PK Mukherjee, E Monte. *Plant Science* 228, 71-78, 2014. 22, 2014. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. N Sadfi-Zouaoui, I Hannachi, M Rouaissi, MR Hajlaoui, MB Rubio, ... *Canadian journal of microbiology* 55.
174. Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane // *Microbiological reviews*. – 1992. – V. 56. – № 3. – P. 395-411.
175. Vakulenko S. B., Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future // *Clinical microbiology reviews*. – 2003. – V. 16. – № 3. – P. 430-450
176. Valdezate, S. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains / S. Valdezate, A. Vindel, E.

- Loza // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – V. 45. – № 5. – P. 1581-1584
177. Van Loon L.C., Van Strien E.A The families of pathogenes related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Path.*, 1999, 55: 85-97
178. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Ruocco M., Woo S., Lorito M. Trichoderma secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun* 2012; 7: 1545-1550.
179. Visalli, M. A. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis* / M. A. Visalli, E. Murphy, S. J. Projan// Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – V. 47. – № 2. – P. 665-669.
180. Volkov, A.G. Plant electrophysiology : theory and methods / A.G .Volkov// Berlin : Springer.– 2006. –508 c.
181. Wachino, J., Arakawa, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update / J. Wachino, Y. Arakawa // Drug Resistance Updates. – 2012. – V. 15. – № 3. – P. 133-148.
182. Wall M.E. Plant antimutagenic agents. 2. Flavonoids I M.E. Wall, M.C. Wani, G. Manikumar et al. II *J. Natur. Prod.* -1988 - V. 51. - P. 1084-1091.
183. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids / T. Walle//Free Radic. Biol. Med. 2004. - V. 36. - P. 829-837
184. Walsh, T. R. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? / T. R. Walsh, M. A. Toleman, L. Poirel // *Clinical microbiology reviews.* – 2005. – V. 18. – № 2. – P. 306–325.
185. Walsh, T. R., MacGowan, A. P., Bennett, P. M. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas*

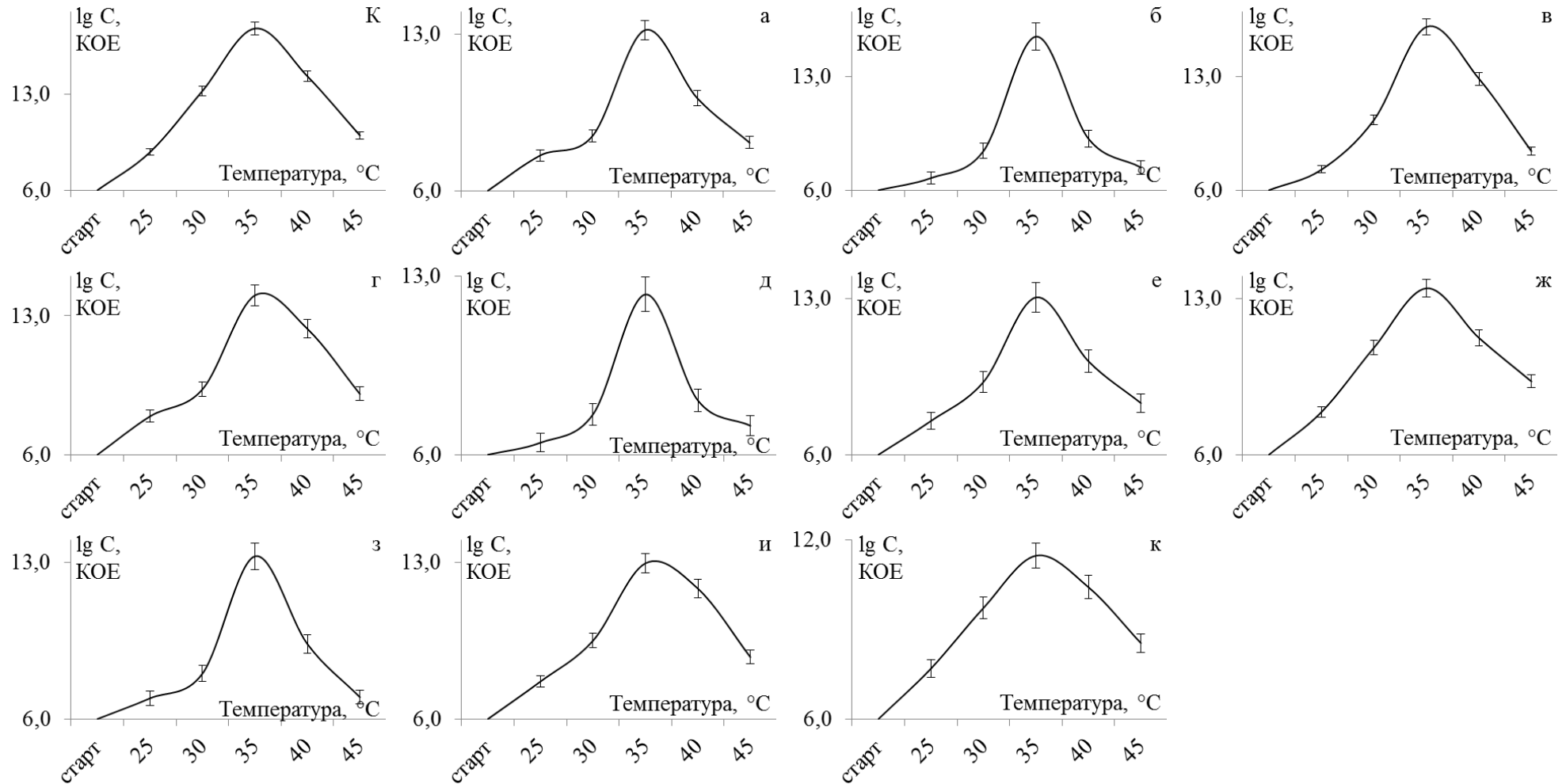
- maltophilia // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1997. – V. 41. – № 7. – P. 1460–1464.
186. Wink, M. Biochemistry, Physiology and Ecological Function of Secondary Metabolites. Chapter 1, Introduction / M. Wink // Annual Plant Reviews. – 2010. – V. 40. – P.1-19.
187. Zhang, L., Li X-Z., Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – V. 45. – № 12. – P. 3497-3503
188. Zobel, A.M. Cytoplasmic and apoplastic location of phenolic compounds in the covering tissue of the *Brassica napus* radicle between embryogenesis and germination / A.M. Zobel // Ann Bot. 1999. – V.64. – P.149-151.
189. Кулешова Е. С. Выделение антибиотических веществ из разных сортов ячменя и исследование их биологического действия: дисс. ... канд. биол. наук. – Воронеж, – 2014. – 157с.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1



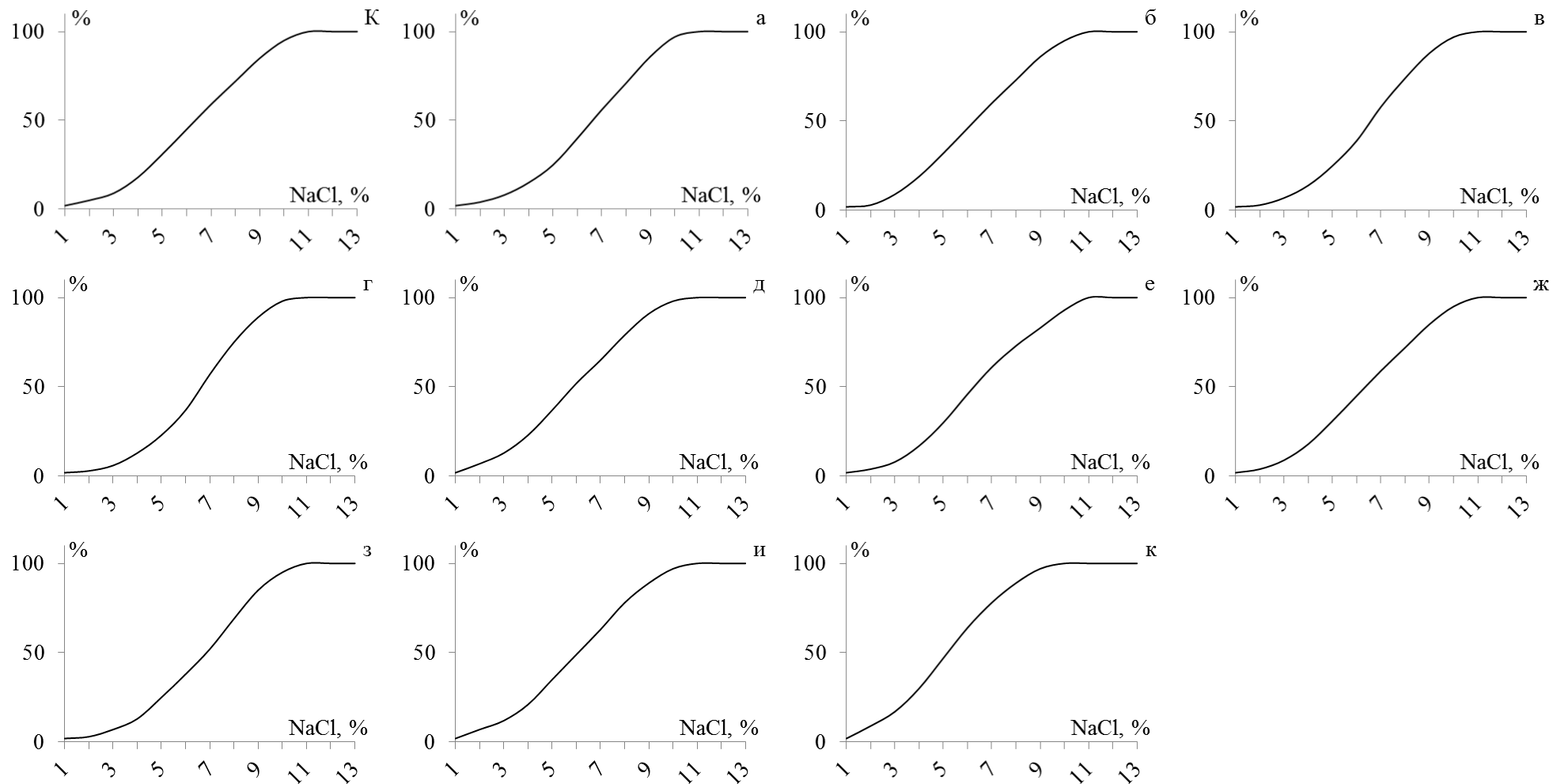
Кривые роста *E. coli* при совместном инкубировании с препаратами: а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2



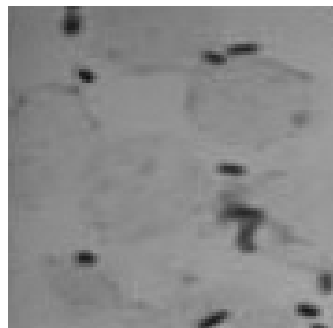
Кривые термоллабильности *E. coli* при совместном инкубировании с препаратами: а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

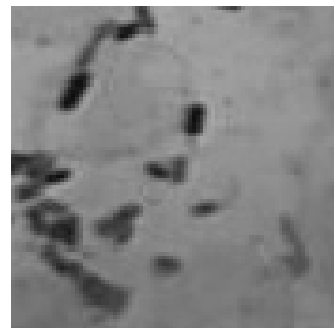


Кривые осмотической резистентности *E. coli* при совместном инкубировании с препаратами: а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

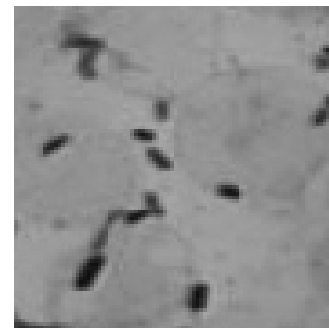
ПРИЛОЖЕНИЕ 4



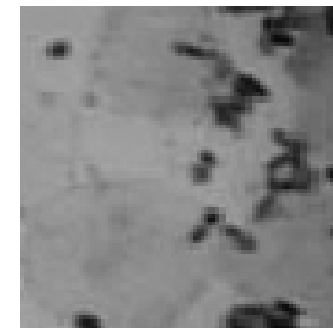
К



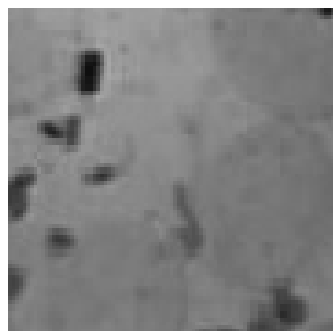
а



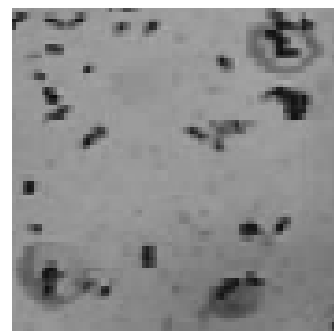
б



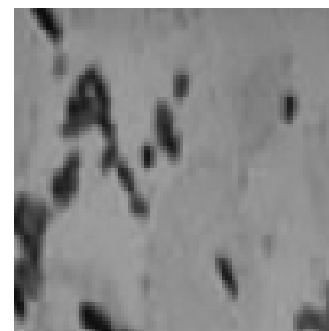
В



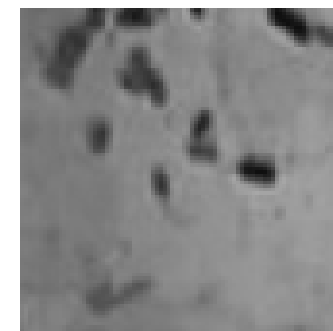
Г



Д



е

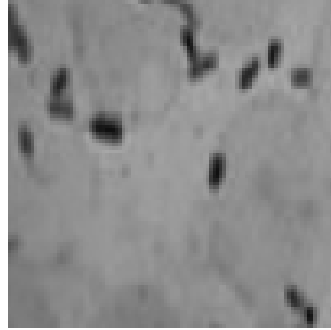
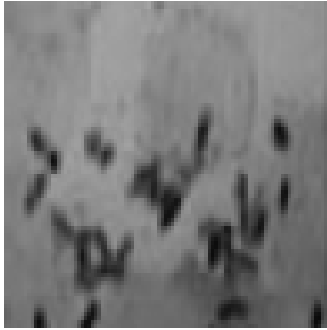


Ж

З

И

К



Микроскопия препаратов эритроцитов I(O) с адгезированными *E. coli* (комбинированная окраска по Граму и Романовскому-Гимзе): при совместном инкубировании с препаратами: а – *T. atrobrunneum*, б – *T. lignorum*, в – *T. lixii* Pat, г – *T. viride*, д – биофлавоноиды, е – дигидрокверцетин, ж – рутин, з – рутифлав, и – авенацин, к – гордецин.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

на товарный знак (знак обслуживания)
№ 551481

РутиФлав

Правообладатель: *Общество с ограниченной ответственностью "Биосинтез", 302010, г. Орел, пер. Маслозаводской, 8, кв. 1 (RU)*

Заявка № 2014708168

Приоритет товарного знака 17 марта 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре товарных знаков и знаков обслуживания

Российской Федерации 28 августа 2015 г.

Срок действия регистрации истекает 17 марта 2024 г.

Заместитель руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2626174

Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования*

"Орловский государственный аграрный университет" (RU)

Авторы: *Павловская Нинэль Ефимовна (RU), Гагарина Ирина Николаевна (RU), Бородин Дмитрий Борисович (RU),*

Солохина Ирина Юрьевна (RU), Гнеушева Ирина Алексеевна (RU),

Костромичева Екатерина Вячеславовна (RU),

Лушников Алексей Валерьевич (RU), Рожкова Татьяна Сергеевна (RU)

Заявка № 2016104159

Приоритет изобретения 09 февраля 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 июля 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 09 февраля 2036 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Налиев



ПРИЛОЖЕНИЕ 7



НАЦИОНАЛЬНЫЙ БИОРЕСУРСНЫЙ ЦЕНТР
Всероссийская коллекция промышленных
микробактерий (БРЦ ВКПМ)
НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика

117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, тел: (495) 315 12 10, e-mail: vkpm@genetika.ru

№ 1434

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр Всероссийская Коллекция Промышленных
Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» –
ГосНИИгенетика приняла на национальное патентное депонирование
культуру:

Trichoderma atrobrunneum 14

Дата депонирования: 04 мая 2018 года

Депозитор: ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет
им. Н.В.Парахина»

Продукт, продуцируемый штаммом (область применения штамма):
Биологически активные соединения, обладающие антигрибной и
антибактериальной активностью

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: F-1434

Директор БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. В. ПАРАХИНА»



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по НиИД

ФГБОУ ВО Орловский ГАУ

С. А. Родимцев

« 18 » 07 2018 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ

получения биологически активных соединений
из грибов *Trichoderma atrobrunneum* F-1434, обладающих
антибактериальной и антигрибной активностью

№ 1

Срок действия регламента до " 18 " 07 20 22 г

Орел-2018

ПРИЛОЖЕНИЕ 9

302501, Россия, Орловская область,
Орловский район, пос. Биофабрика

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора по производству
ФКП «Орловская биофабрика»



Н. Н. Мятечкин

АКТ

проверки субстанции, предназначенной для производства биопродукции для ветеринарии по ГОСТ 31674-2012 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности от 14.07.2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, начальник ОБТК- Дурнева Т. В., микробиолог ОБТК- Домарева А. Г., технолог цеха ПБП- Маркина О. А. составили настоящий акт о том, что в период с 10.07.2017 по 14.07.2017 провели проверку субстанции, предназначенной для производства биопродукции для ветеринарии, предоставленную ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет им. Н. В. Парахина» по ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности».

Проведено:

1. Определение общей токсичности биопробой на кроликах;
2. Определение общей токсичности в опыте на мышах.

Проведение испытаний:

1. Методы основаны на испытании образцов методом биотестирования параллельно на кроликах (кожная проба) и на мышах (острый опыт), что дает возможность учесть как дермонекротическое действие токсинов, так и их воздействие на пищеварительную систему теплокровных животных. Результат определяли по совокупности реакций в обоих методах: субстанция нетоксична (нетоксична в обоих тестах), субстанция токсична (токсична хотя бы в одном тесте);
2. При проведении испытания на определение общей токсичности в опыте на мышах было использовано 10 белых лабораторных мышей массой 18-20 г каждая, выдержанные без корма в течение 4 ч. Пяти мышам с помощью инсулинового шприца вводили однократно через рот в желудок 0,5 см³ выпаренного остатка ацетонового экстракта субстанции. В качестве контрольного испытания пяти белым мышам вводили по 0,5 см растительного масла, которым разводили экстракт. Наблюдали за мышами в течение 3 суток, не ограничивая их в кормах и воде. Через трое суток мышей усыпляли медицинским эфиром и вскрывали. Учет реакции вели на основании анализа состояния внутренних органов (желудочно-кишечного тракта, печени, селезенки, почек) при вскрытии мышей.
3. При проведении испытания на определение общей токсичности биопробой на кроликах был использован один кролик. На выстриженный участок кожи кролика пластиковой лопаткой наносили, слегка втирая, половину экстракта, вторую половину экстракта повторно наносили на следующий день. В качестве контроля использовали один оголенный участок кожи с размерами 6х6 см, на который не наносили экстракт. Наблюдение за реакцией начинали на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжали в течение 3 суток. Токсичность исследуемого образца определяли по наличию воспалительного процесса на участке кожи с нанесенным экстрактом.

Обработка результатов:

У кролика отсутствует воспалительная реакция кожи, гиперемия, изменений в состоянии и поведении не зафиксировано.

Мыши (испытуемые и контрольные) живы, при вскрытии убитых мышей патологоанатомических изменений не обнаружено.

Заключение:

Согласно проведенным испытаниям, выполненным в соответствии с ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности», исследуемая субстанция не токсична.

ИСПОЛНИТЕЛИ:

Начальник ОБТК

Дурнева Т. В.

Микробиолог ОБТК

Домарева А. Г.

Технолог цеха ПБП

Маркина О. А.

ПРИЛОЖЕНИЕ 10

302501, Россия, Орловская область,
Орловский район, пос. Биофабрика

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФКП «Орловская биофабрика»



М.П.

В.Н. Трифан

АКТ

сравнительных комиссионных испытаний бактериостатической композиции метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* F-1434 (ВКПМ), на КМЦ основе, против условно-патогенной микрофлоры.

Мы, нижеподписавшиеся
зам. директора по производству Мятечкин Н. Н.,
начальник цеха ПБП Зулев Г. С.
микробиолог ОБТК Рошупкина А. Г.

составили настоящий акт в том, что в период с 19 июля по 28 июля 2018 г. нами было проведено изучение влияния представленной бактериостатической композиции на микробиологическую чистоту, безвредность, аллергенность, токсичность.

Цель проводимых испытаний:

1. изготовить бактериостатическую композицию метаболитов *T. atrobrunneum* на КМЦ основе;
2. определить микробиологическую чистоту;
3. определить аллергенность;
4. определить безвредность полученной композиции;

В результате проделанной работы была получена бактериостатическая композиция против условно-патогенной микрофлоры.

Бактериостатическая композиция изготовлена путем соединения препарата метаболитов *T. atrobrunneum* F-1434 (ВКПМ), полученных по ЛТР №1 от 18.07.2018 ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ», и раствора крабоксиметилцеллюлозы (ГОСТ 5.588-70) в воде для инъекций (ФС.2.2.0019.15) 0,5% (w/v).

В бактериостатической композиции объемная доля препарата метаболитов *T. atrobrunneum* была доведена до 3% (v/v) 0,5% раствором КМЦ.

Смешивание препарата метаболитов *T. atrobrunneum* и КМЦ основы производили в асептических условиях на магнитной мешалке в течение 60 минут при 3000 об/мин.

Микробиологическая чистота определялась прямым посевом на среды МПА, МПБ, МППБ, Сабуро, с последующей микроскопией окрашенных по Граму мазков из выросших колоний.

Аллергенность определяли скарификационной кожной пробой с поверхностным нанесением исследуемого препарата на трех клинически здоровых кроликах массой 2,5-3,0 кг, наблюдали в течение часа.

Безвредность образца бактериостатической композиции определяли путем подкожного введения в объеме 1 см (по 0,5 см слева и справа в области наружной поверхности бедра) трем клинически здоровым кроликам массой 2,5-3,0 кг. Срок наблюдения в течение 10 суток.

Заключение

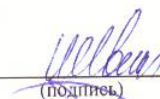
Сравнительные комиссионные испытания бактериостатической композиции метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* F-1434 (ВКПМ), на КМЦ основе, против условно-патогенной микрофлоры позволили установить следующее:

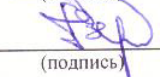
- в результате проведенной работы по конструированию бактериостатической композиции метаболитов, в которой в качестве основы дисперсной системы является карбоксиметилцеллюлоза, была получена стабильная эмульсия;
- микробиологическая чистота соответствует требованиям ОФС.1.2.4.0002.15;
- бактериостатическая композиция в испытаниях на кроликах показала себя безвредной и умеренно реактогенной.

Заместитель директора по производству
(занимаемая должность)

Начальник цеха ПБП
(занимаемая должность)

Микробиолог ОБТК
(занимаемая должность)


(подпись)


(подпись)


(подпись)

Н. Н. Мятечкин
(фамилия, инициалы)

Г. С. Зулев
(фамилия, инициалы)

А. Г. Рошупкина
(фамилия, инициалы)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО Орловский ГАУ

д.э.н., доцент



Е. Ю. Калиничева Е. Ю. Калиничева

«*15*» *02* 201*9* г

АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс
«___» _____ 201__ г

Комиссия в составе: председатель методической комиссии факультета биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Орловский ГАУ по направлениям 19.03.01 и 19.04.01- Биотехнология д.б.н., профессор Павловская Н.Е., члены комиссии: доцент кафедры биотехнологии Гагарина И.Н., доцент кафедры биотехнологии Горькова И.В. составили настоящий акт о нижеследующем:

проведение экспертизы рабочих программ, учебных и учебно-методических пособий кафедры биотехнологии на предмет использования в учебном процессе результатов исследований диссертационной работы соискателя Лушников А.В.

Установлено, что материалы диссертационной работы Лушников А.В. «Обоснование использования некоторых растительных и грибных метаболитов в биотехнологии антибиотических препаратов» используются при проведении занятий по дисциплинам: «Технология антибиотиков» и «Прикладная генетическая и белковая инженерия» с обучающимися по направлению 19.03.01– Биотехнология.

Настоящий Акт составлен:

Председатель методической комиссии
факультета биотехнологии и ветеринарной
медицины по направлениям
19.03.01 и 19.04.01 – Биотехнология

Павловская Н.Е.

Содержание настоящего Акта подтверждаем:

Доцент кафедры биотехнологии

Гагарина И.Н.

Доцент кафедры биотехнологии

Горькова И.В.

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

№ 623
Паб. н.д.

29.01.2019	004332	2019102438
Дата поступления	Входящий №	Регистрационный №

Заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение

(1) ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ (сдвигается) 29 ЯНВ 2019	(2) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № 004332	(3) ВХОДЯЩИЙ № 2019102438
(15) ДАТА ПЕРЕВОДА из международной заявки на национальную фазу		
<input type="checkbox"/> (10) ФИПС (Федеральный институт промышленной собственности) <input type="checkbox"/> (17) Автор и автор изобретения (физическое лицо) <input type="checkbox"/> (18) Автор изобретения (юридическое лицо) <input type="checkbox"/> (19) Автор и автор изобретения (физическое лицо) <input type="checkbox"/> (20) Автор и автор изобретения (юридическое лицо)	АДРЕС ДЛЯ ПЕРВИЧНОЙ (Первичный адрес, фактический и юридический или интеллектуальный адрес) 303115, г. Орск, ул. Гвардейцев Рязанского направления, дом 68, ФГБОУ ВО Орский ГАУ, 4474	
АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРВИЧНОЙ (Секретный адрес, фактический и юридический или интеллектуальный адрес) Телефон: 4863-(76-18-45) Факс: 4863-(76-08-64) E-mail: info@ips.fips.ru		
ЗАЯВИТЕЛЬ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		
В Федеральную службу по интеллектуальной собственности (Федеральный институт промышленной собственности), 125993, Российская Федерация		
(34) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Штамм <i>Trichoderma atroviride</i>, обладающий антибактериальной активностью в отношении <i>Aspergillus niger</i>		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (Физическое или юридическое лицо - при наличии фактически осуществляемого предпринимательства (включая управление имуществом), а также интеллектуальное агентство, патентное бюро или патентный адвокат)	ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ	
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орский государственный аграрный университет имени И.В. Пурганова» (ОГУ), Орск, Россия, 342119	ОГРН 1025706824695 ИНН 575300001 ИНН 575300047 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (по международному ИУ)	
<input type="checkbox"/> изобретение создано за счет средств федерального бюджета <input type="checkbox"/> изобретение создано: <input type="checkbox"/> государственными заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком <input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту	Контракт от №	
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ (Физическое лицо или юридическое лицо - при наличии) (лицо, осуществляющее интеллектуальную деятельность для заявителя для получения патента от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности или интеллектуальными в силу закона)	<input type="checkbox"/> патентов поверенный <input type="checkbox"/> адвокат по интеллектуальной собственности <input type="checkbox"/> представитель по закону	

ОТД 17
30 ЯНВ 2019
240 60 15

53/1

Общее количество документов в листах	33	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Воробьева С. Л.
Количество платяжных документов	1	

Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые ресурсы»

№ 495
11.07.19

Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии)		Телефон:	
Адрес		Факс:	
Срок представительства (если к заявке приложена доверенность представителя заявителя, срок может не указываться)		Адрес электронной почты:	
		Регистрационный номер патентного поверенного	
(72) АВТОР Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии)	Адрес места жительства, включающий официальное наименование страны и ее код		
Павловская Нинэль Ефимовна	ул. Ген. Родина, д. 62, кв.29, г. Орёл, 302019, Россия, RU		
Гнеушева Ирина Алексеевна	пер. Промышленный, дом 3, кв.3 Орловская обл., Урицкий район, п.г.т. Нарышкино, 303900, Россия, RU		
Лушников Алексей Валерьевич	ул. Октябрьская, д. 122, кв.5, г. Орёл, 302040, Россия, RU		
Маркина Ольга Андриановна	ул. Приборостроительная, д. 50, кв.41, г. Орёл, 302027, Россия, RU		
<input type="checkbox"/> Я (мы) (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии)) Прошу (просим) не упоминать меня (нас) как автора(ов) при публикации сведений <input type="checkbox"/> о заявке <input type="checkbox"/> о выдаче патента Подпись(и) автора(ов)			
<input type="checkbox"/> Просьба автора(ов) не упоминать его (их) при публикации прилагается (отмечается при подаче заявки в электронном виде)			
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИЛАГАЕМЫХ ДОКУМЕНТОВ		Количество листов в 1 экз.	Количество экземпляров
<input checked="" type="checkbox"/> описание изобретения		8	2
<input type="checkbox"/> перечень последовательностей			
<input checked="" type="checkbox"/> формула изобретения (количество пунктов формулы _____) (указать)		1	2
<input type="checkbox"/> чертеж(и) и иные материалы фигуры чертежей, предлагаемые для публикации с рефератом _____ (указать)			
<input checked="" type="checkbox"/> реферат		1	2
<input checked="" type="checkbox"/> копия документа, подтверждающего уплату патентной пошлины (пошлин), (предполагается по собственной инициативе заявителя)		1	1
<input checked="" type="checkbox"/> ходатайство о предоставлении права на освобождение от уплаты патентной пошлины или на уплату этой пошлины в уменьшенном размере		1	1
<input type="checkbox"/> копия первой заявки (при использовании конвенционного приоритета)			
<input type="checkbox"/> перевод заявки на русский язык			
<input type="checkbox"/> доверенность			
<input type="checkbox"/> согласие представителя заявителя на обработку его персональных данных			
<input type="checkbox"/> просьба автора(ов) не упоминать его (их) при публикации			
<input checked="" type="checkbox"/> другой документ (свидетельство о гос. аккредитации ФГБОУ ВО Орловский ГАУ) (копия справки о аккредитации)		1 1	1 1



ФОНД СОДЕЙСТВИЯ РАЗВИТИЮ
малых форм предприятий в научно-технической сфере

ДИПЛОМ

Победитель программы “Участник молодежного
научно-инновационного конкурса” (“УМНИК”)

Лушников Алексей Валерьевич

*Председатель
Наблюдательного совета*

*Генеральный директор
Фонда содействия развитию
малых форм предприятий
в научно-технической сфере*



И.М. Бортник

С.Г. Поляков