

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Орловский государственный аграрный университет  
имени Н.В. Парахина»

На правах рукописи

Лушников Алексей Валерьевич

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

1.5.6 – Биотехнология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:  
кандидат технических наук, доцент  
Гнеушева Ирина Алексеевна

Орёл, 2024 г.

С 2012 по 2023 гг. диссертационная работа была выполнена  
под научным руководством доктора биологических наук,

Заслуженного работника Высшей школы РФ,

профессора ФГБОУ ВО Орловский ГАУ

Павловской Нинэль Ефимовны

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Эубиоз и дисбиоз кишечника.....	11
1.2 Облигатная микробиота – источник БАВ.....	18
1.3 Грибы рода <i>Trichoderma</i> – продуценты БАВ .....	20
1.4 Пробиотики для коррекции микробиоценоза кишечника .....	25
1.5 Применение пробиотиков в ветеринарной медицине .....	32
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Объекты исследования .....	35
2.2 Реактивы и расходные материалы.....	35
2.3 Оборудование .....	36
2.4 Методы исследования.....	37
ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ .....	46
3.1 Скрининг антагонистически активных штаммов <i>Trichoderma spp.</i> .....	46
3.2 Биологические свойства перспективного штамма-продуцента .....	48
3.2.1 Молекулярно-генетическая идентификация .....	48
3.2.2 Культуральные и морфологические свойства.....	50
3.2.3 Биохимические свойства .....	53
3.3 Подбор условий культивирования <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434.....	55
3.3.1 Исключающий эксперимент .....	55
3.3.2 Выбор субстрата.....	60
3.4 Подбор условий экстракции БАВ <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434.....	65
3.4.1 Выбор источника БАВ.....	65
3.4.2 Выбор экстрагента и условий извлечения БАВ из культуральной жидкости <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 .....	67
3.5 Получение, изучение свойств и состава экстракта культуральной жидкости <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 .....	69
3.5.1 Извлечение БАВ экстракта культуральной жидкости <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 .....	69
3.5.2 Физические, химические и биологические свойства экстракта культуральной жидкости <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 .....	70
3.5.4 Анализ состава экстракта культуральной жидкости <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 .....	74
3.6 Оптимизация условий глубинного культивирования <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F- 1434.....	80
3.6.1 Определение математической модели процесса культивирования.....	80
3.6.2 Установление экстремального отклика методом крутого восхождения.....	84

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРОДУКЦИИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ <i>T.</i> <i>ATROBRUNNEUM</i> ВКПМ F-1434 .....	87
4.1 Конструирование бактериостатической композиции на основе экстракта культуральной жидкости <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 .....	87
4.1.1 Технология получения бактериостатической композиции .....	89
4.1.2 Оценка безвредности бактериостатической композиции .....	95
4.1.3 Оценка влияния бактериостатической композиции на эффективность $\beta$ - лактамовых антибиотиков .....	99
4.1.4 Критерии подлинности экстракта культуральной жидкости <i>T. atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 .....	100
4.2 Конструирование метабиотика на основе бактериостатической композиции	101
4.2.1 Обоснование выбора компонентов метабиотика .....	101
4.2.1 Технология получения метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника .....	103
4.3 Метод определения массовой доли экстракта культуральной жидкости <i>T.</i> <i>atrobrunneum</i> ВКПМ F-1434 в биопродукции .....	114
4.4 Экспериментальное подтверждение коррекции микробиоценоза кишечника в опыте <i>in vivo</i> .....	117
ВЫВОДЫ .....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	124
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	152

## ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

Например, для коррекции микробиоценоза пищеварительного тракта и стимуляции иммунной системы при заболеваниях крупного рогатого скота, свиней и птицы разработана конкурентоспособная технология получения ветеринарных пробиотических препаратов на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-454 Д «Бацинил» и «Бацинил-К». Данные препараты характеризуются высокой антагонистической активностью в отношении

патогенных и условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Salmonellas* sp. – возбудителей инфекционных болезней животных, а технология их получения имеет высокую эффективность и является энергосберегающей, безотходной. «Симбиолакт» - смесь культур пробиотических и молочнокислых микроорганизмов: *Lactobacillus paracasei* LC-01™, *Lactobacillus acidophilus* LA-5®, *Lactococcus lactis* R-707-1™, *Bifidobacterium* BB-12®.

Надо сказать, что сдерживание использования в пробиотических препаратах спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* вызывается трудностью очистки, поэтому в настоящее время изыскиваются микробные продуценты БАВ с высокой биологической активностью. К ним относятся и грибы рода *Trichoderma*, в процессе своей жизнедеятельности, выделяющие различные метаболиты, которые благодаря своей полифункциональности, обеспечивают лидирующее положение среди других микробных продуцентов.

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

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

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

1. отобрать перспективный штамм-антагонист *Trichoderma* spp. в отношении представителей кишечного микробиоценоза и провести его молекулярно-генетическую идентификацию, изучить биохимические и культуральные свойства, подобрать условия культивирования продуцента;

2. подобрать условия извлечения БАВ штамма-продуцента, изучить их физические, химические и биологические свойства, оптимизировать условий получения с целью максимального накопления;
3. разработать технологии получения биопродукции на основе БАВ штамма-продуцента;
4. разработать метод оценки качества и контроля количественного состава БАВ штамма-продуцента в биопродукции;
5. подтвердить коррекцию микробиоценоза кишечника разработанным метабитиком в опытах *in vitro* и *in vivo*.

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

Для продуцента разработаны оригинальная питательная среда и оптимальные условия культивирования.

Путем математического моделирования и оптимизации получен экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, установлен состав, природа и бактериостатическая активность, специфичность экстракта и его компонентов.

Разработана технология получения бактериостатической композиции и метабитика на ее основе.

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

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

Разработан лабораторный регламент на производство бактериостатической

композиции на основе экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

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

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

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

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

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

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

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

Технологии получения бактериостатической композиции и метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника животных.

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

**Личный вклад автора.** Личный вклад заключается в формировании цели и задач диссертации, проведении лабораторных культивирований, обработке и анализе полученных результатов, проведении математических расчетов, обсуждении результатов, формулировке выводов, написании публикаций по теме



диссертационного исследования и представлении на международных и всероссийских конференция.

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

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

**Соответствие паспорту научной специальности.** Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 – Биотехнология: п. 3 «Микробная и

клеточная биотехнология»; п. 9 «Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней»; п. 25 «Технологии биологически-активных соединений и биопрепаратов»; п. 29 «Оценка безопасности, качества и функционального потенциала биотехнологических штаммов-продуцентов. Молекулярно-генетическое маркирование штаммов – продуцентов. Методы контроля подлинности биотехнологических продуктов».

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

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

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю признательность и глубокую благодарность доктору биологических наук, профессору, ~~з~~заведующей кафедрой Биотехнологии Павловской Нинэль Ефимовне за научное руководство и создание комфортных условий плодотворной работы, а также коллективу кафедры Биотехнологии Орловского ГАУ за оказание помощи на всех этапах выполнения диссертационной работы.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Эубиоз и дисбиоз кишечника

В ходе эволюции много веков назад человеческий организм, взаимодействуя с миром микроорганизмов, отбирал микроорганизмы, полезные для его жизнедеятельности. Потребность в них обусловлена нормальным функционированием биотопов, органов и систем [66, 122, 145].

Нормальная микрофлора – это определенное качественное и количественное соотношение микроорганизмов в отдельной системе органов, которое обуславливает поддержание метаболического, биохимического и иммунологического баланса, необходимого для сбалансированного поддержания здоровья животных и человека. Эти микроорганизмы способны выполнять питательные и защитные функции на первом уровне гомеостаза организма, нарушение которого напрямую приводит к появлению различных заболеваний организма [20, 55, 62, 83, 125, 228, 233].

Нормальная микрофлора кишечника у здорового взрослого организма представлена микрофлорой, изначально заселенной микроорганизмами, поступающими с пищей с рождения. В 98% случаев это анаэробные бактерии, которые осваивают пищу в кишечном тракте, создают защитную биологическую пленку в кишечной стенке и накапливаются в большой концентрации (до  $10^{12}$  КОЕ). Считается, что микрофлора кишечника, приобретенная на ранних этапах жизни организма, глубоко влияет на физиологический и морфологический статус организма. Многими исследователями доказано, что первоначальный рост молодого организма, его потребность в питательных компонентах, резистентность к инфекциям и другим неблагоприятным воздействиям окружающей среды, многие наследственные характеристики организма определяются микробиотой. Недаром характер микроэкологии кишечного тракта служит критерием оценки общего состояния организма [17, 72, 77, 200].

К наиболее важным для дифференциальной диагностики дисбактериозов относится:

Бифидобактерии являются самым распространенным представителем микробиоты пищеварительного тракта. Это облигатно-анаэробные грампозитивные бактерии, им свойственна множественная морфологическая дифференцировка, а так же они способны группироваться в многоклеточные структуры (таблица 1). Культивируются на среде Блаурокк и ее модификациях [72].

Таблица 1. Нормальный микробиоценоз кишечника [126]

микроорганизмы		годы		
		$\leq 1$	1–60	$\geq 60$
бифидобактерии		$10^{10}-10^{11}$	$10^9-10^{10}$	$10^8-10^9$
лактобактерии		$10^6-10^7$	$10^7-10^8$	$10^6-10^7$
бактероиды		$10^7-10^8$	$10^9-10^{10}$	$10^{10}-10^{11}$
энтерококки		$10^5-10^7$	$10^5-10^8$	$10^6-10^7$
фузобактерии		$<10^6$	$10^8-10^9$	$10^8-10^9$
эубактерии		$10^6-10^7$	$10^9-10^{10}$	$10^9-10^{10}$
пептострептококки		$<10^5$	$10^9-10^{10}$	$10^{10}$
клостридии		$<10^3$	$<10^5$	$<10^6$
эшерихии	типичные	$10^7-10^8$	$10^7-10^8$	$10^7-10^8$
	лактозонегативные	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
	гемолитические	0	0	0
условно-патогенные бактерии		$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$
стафилококк	золотистый	0	0	0
	эпидермальный	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$
дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>		$<10^3$	$<10^4$	$<10^4$
неферментирующие бактерии		$<10^3$	$<10^4$	$<10^4$

Лактобациллы – второй по численности представитель микробиоты пищеварительного тракта, род *Lactobacillus* включает около 50 видов [49]. Относятся к грампозитивным палочкам, культивируются на среде MRS, G-58 в аэробных или гиперкапнических условиях, при  $pCO_2$  5-15% [22, 107].

Энтерококки – принадлежат к отдельному роду *Enterococcus*, хотя до 1984 их относили к роду *Streptococcus* группы Д. Это грампозитивные, неподвижные, парноосидающие микроорганизмы сферические, иногда бывают ланцетовидной формы, могут собираться в цепочки и терять различие со стрептококками. Факультативные анаэробы, растут на простых и селективных средах в избытке хлорида натрия, дают положительную реакцию на гемолиз по  $\gamma$ -типу [87, 96].

Эшерихии – для здорового организма являются безвредными. Однако существует группа «диарогенных» кишечных палочек, способные вызывать диарею с признаками острой кишечной инфекции. К ним относятся: (EPEC) энтеропатогенные-, (ETEC) энтеротоксигенные-, (EAgEC) энтероадгезивные-/энтероаггегативные-, (EIEC) энтероинвазивные-, (EHEC) энтерогеморрагическое кишечные палочки. Естественным местом обитания является дистальный отдел подвздошной кишки и толстый кишечник. Эшерихии относятся к факультативным анаэробам, культивируются на простых и селективных (Эндо, Левина, Клигlera и т.д.) питательных средах [96].

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* – является грибом-оппортунистом, хотя без симптомов присутствует у 80% здоровых организмов. Характерный кандидоз развивается при иммунодефицитах. Растет на простых питательных средах, для селективного выделения используют среды с антибактериальными препаратами [6, 10, 19, 23, 66].

Условно-патогенных микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний, с которыми организм, как человека, так и животного взаимодействует в процессе жизнедеятельности [96]. Микроорганизмы данной группы могут присутствовать в организме, как в латентной, так и в активной форме. Микробиота кишечника может содержать более 100 различных энтеро- и аденовирусов, представителей аэробной и анаэробной флоры [8, 21, 31, 75, 141].

Неферментирующие бактерии – или НГОБ (неферментирующие грамотрицательные бактерии) таксономически гетерогенная группа бактерий, не способных ассимилировать глюкозу. Неприхотливы к питательным средам, для установления принадлежности к НГОБ используют тест Хью-Лейфсона [58, 89]

Микробиота желудочно-кишечного тракта является важным звеном в жизнеобеспечении животных и человека. Под ним понимается качественный и количественный состав микроорганизмов, характерный для различных видов организмов. Микробиоценоз кишечника у разных видов неодинаков и на протяжении всей жизни его состав варьирует у одного и того же организма под воздействием экзогенных и эндогенных факторов [10, 115, 141, 151, 163, 204].

Существует несколько типов дисбактериоза - понятие, введенное в научную литературу для обозначения изменений микрофлоры в организме животных под воздействием различных факторов. В современном понимании дисбактериоз – это совокупность изменений в макроорганизме, вызванных нарушением количественных пропорций и состава его микрофлоры [75, 76, 142, 253]

Основываясь на различиях в микробных состояниях тонкой и толстой кишки, Циммерман предлагает охарактеризовать дисбиоз как нарушение микробиоза в различных отделах кишечника и выявить возможные признаки того, что конкретно его выражает [118, 149, 162].

Блинкова выделяет потенциальный дисбактериоз. Это выражается не в изменении количественных параметров и соотношения различных групп нормальной микрофлоры, а в снижении функциональной активности микробных клеток (лактобацилл, бифидобактерий), что в конечном итоге приводит к клинически выраженным нарушениям микробного гомеостаза организма [13,263,129].

Бактериальный антагонизм нормальной микробиоты в отношении возбудителей кишечных инфекций впервые был описан И.И. Мечниковым. Развитию патологических процессов могут способствовать нарушения количественного и качественного состава комменсальной микробиоты кишечника, вызванные расстройствами питания, эмоциональных и физических

нагрузок, иммунодефицита, влиянием окружающей среды, применением антимикробных препаратов. Патологическое состояние организма, обусловленное развитием различных гастроинтестинальных нарушений, сопровождаемое метаболическими, иммунологическими отклонениями, вследствие изменения качественного и/или количественного состава микробиоценоза кишечника называют энтеробактериозом. Современная медицина оспаривает с попытками отвергнуть термины "дисбактериоз" и "дисбиоз", в профессиональной литературе введено понятие "избыточный рост бактерий" ("bacterial overgrowth") или "синдром избыточного роста бактерий" ("bacterial overgrowth syndrome") - нарушение качественного и количественного состава микробиоценоза кишечника, при котором число условно-патогенных бактерий не соответствует таковому у здорового организма. Дисбиоз кишечника всегда рассматривался как синдром, включающий комплекс симптомов, вызванный уменьшением числа представителей нормальной микрофлоры, с замещением ее минорными либо полной реколонизацией транзиторной категориями микроорганизмов [37, 147, 150, 176, 215].

Этиология: расстройства питания, хронические соматические заболевания, в том числе ЖКТ, хирургические вмешательства, нейро-гуморальные и иммунные нарушения, лекарственные средства, чрезмерные физические и психические нагрузки [52, 53, 119].

Дисбиоз толстой кишки может свидетельствовать об изменениях физиологического состояния организма, выраженных в снижении иммунитета, повышении реактогенности, обострении хронических инфекций [48, 192, 196].

Одним из важнейших факторов, способных нарушить микробную экологию биотопов хозяина – антибиотические препараты (АБП), основной причиной их губительного воздействия является идентичность структур нормальной и патогенной микрофлоры. Следует отметить, что бифидо- и лактобактерии крайне чувствительны к АБП, в то время как их продолжительное употребление приводит к формированию резистентности у патогенных микроорганизмов. Это явление характерно для некорректного применения АБП, хотя и обоснованное

применение способно вызвать ассоциированный с антибиотиками дисбиоз, который может осложниться в псевдомембранозный колит [57, 65, 118, 134, 186, 198].

Первым этапом патогенеза дисбиотических расстройств является нарушение баланса условно-патогенной микробиоты и факторами неспецифической защиты организма-хозяина, включая его симбиотический биотоп [85, 140, 214]. Дисбаланс состава кишечной микробиоты, вызванным дестабилизирующим фактором, с нарушением ее функций и межвидового взаимодействия называют дисбиозом. При сохранении адаптационных резервов изменения носят транзиторный характер и при устранении влияющего фактора их последствия могут не обнаруживаться [68, 129, 151, 268].

Уменьшение численности облигатной микробиоты (бифидо- и лактобактерий) приводит к изменению показателя рН кишечного содержимого в щелочную сторону, что нарушает работу ферментативной системы симбионтов, снижает резистентность кишечника. Увеличивается число условно-патогенных микроорганизмов, которые начинают преобладать в микробиоте, при этом их продукты жизнедеятельности нарушают работу кишечника: снижают проницаемость, тормозят перистальтику. Продолжительный дисбиоз кишечника может привести к изменениям слизистой оболочки [11, 19, 96, 231].

Клинические формы: латентная (субклиническая), местная (локальная), распространенная (системная). Дисбиоз может иметь длительное или периодическое течение вплоть до бессимптомного; в данном случае колебания численности отдельных микроорганизмов нивелируются самостоятельно, однако исключить развитие осложнений, в том числе иммунопатий, невозможно [126, 198, 211].

Степень компенсации: компенсированная, субкомпенсированная, декомпенсированная. Протокол ведения больных с энтеробактериозом выделяет 3 степени дисбиоза, для которых определены значения показателей облигатных и условно-патогенных микроорганизмов [52, 123, 187] (таблица 2).



Таблица 2. Количественная оценка дисбиоза кишечника [126]

годы	степень дисбиоза		I степень	II степень	III степень
	микроорганизм		КОЕ/г фекалий		
≤1	бифидобактерии		↓ ≥ 10 <sup>9</sup> – 10 <sup>8</sup>	↓ ≥ 10 <sup>8</sup>	↓ ≥ 10 <sup>8</sup>
	лактобактерии		↓ ≥ 10 <sup>5</sup> – 10 <sup>4</sup>	↓ ≥ 10 <sup>4</sup>	↓ ≥ 10 <sup>4</sup>
	эшерихии	типичные	↓ ≥ 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>5</sup> или ↑ ≤ 10 <sup>9</sup> – 10 <sup>10</sup>		
		гемолитические		↑ ≥ 10 <sup>5</sup> – 10 <sup>7</sup>	
	условно-патогенные			↑ ≤ 10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup>	↑ ≥ 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>7</sup>
1–60	бифидобактерии		↓ ≥ 10 <sup>8</sup> – 10 <sup>7</sup>	↓ ≥ 10 <sup>7</sup>	↓ ≥ 10 <sup>7</sup>
	лактобактерии		↓ ≥ 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>5</sup>	↓ ≥ 10 <sup>5</sup>	↓ ≥ 10 <sup>5</sup>
	эшерихии	типичные	↓ ≥ 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>5</sup> или ↑ ≤ 10 <sup>9</sup> – 10 <sup>10</sup>		
		гемолитические		↑ ≥ 10 <sup>5</sup> – 10 <sup>7</sup>	
	условно-патогенные			↑ ≤ 10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup>	↑ ≥ 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>7</sup>
≥60	бифидобактерии		↓ ≥ 10 <sup>7</sup> – 10 <sup>6</sup>	↓ ≥ 10 <sup>6</sup>	↓ ≥ 10 <sup>6</sup>
	лактобактерии		↓ ≥ 10 <sup>5</sup> – 10 <sup>4</sup>	↓ ≥ 10 <sup>5</sup>	↓ ≥ 10 <sup>4</sup>
	эшерихии	типичные	↓ ≥ 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>5</sup> или ↑ ≤ 10 <sup>9</sup> – 10 <sup>10</sup>		
		гемолитические		↑ ≥ 10 <sup>5</sup> – 10 <sup>7</sup>	
	условно-патогенные			↑ ≤ 10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup>	↑ ≥ 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>7</sup>

Клинические проявления разнообразны, объединены в синдромы:

- желудочно-кишечная диспепсия: анорексия, изжога, горький привкус во рту, тошнота, отрыжка, боли в животе различной локализации, расстройства дефекации;
- синдром правого и левого подреберья: приступообразное болезненное вздутие живота и усиление выделения газа;
- мальабсорбция: упорная диарея с преобладанием гнилостного брожения, стеатореей, нарушением всасывания желчных кислот;
- аноректальный синдром: тупые боли в аноректальной области, зуд вокруг ануса, многократные потуги с выделением слизи или крови;
- полигиповитаминоз: В<sub>1</sub> – нарушение моторной функции ЖКТ со склонностью к атонии; В<sub>2</sub> – ангулярный стоматит, глоссит, периоральный дерматит, изменение ногтей и волос; В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> – нормохромная анемия, реже гиперхромная; РР – психо-эмоциональные расстройства, глоссит, фарингит, гиперсаливация.

### **1.2 Облигатная микробиота – источник БАВ**

В дистальных отделах пищеварительного тракта наибольшее распространение имеют лактобактерии *L. acidophilus* (12%), *L. brevis* (28%), *L. casei* (9,5%), *L. cellobiosus* (9,5%), *L. plantarum* (19%), они обладают выгодным сочетанием адгезивной способности и антагонистической активности, за счет чего являются своеобразными регуляторами местного микробиоценоза, угнетая рост и размножение транзитных микроорганизмов. Уменьшение количества лактобацилл приводит к развитию дисбиотических расстройств.

Лактобациллы имеют широкий спектр антагонизма к аэробным, так и анаэробным микроорганизмам. Больше всех антагонизм проявляют *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* и *L. buchnei* [129, 146, 160, 263].

Антагонистический эффект лактобактерий вызван конкурентной борьбой за эпителии и способностью к более быстрому росту. Лактобациллы участвуют в устойчивости к образованию колоний за счет продукции молочной кислоты,

протеаз, липаз и специфических антимикробных компонентов, препятствующих адгезии патогенных микроорганизмов, а так же способны блокировать адгезиновые рецепторы клеток слизистой оболочки и образовывать защитные биопленки на поверхности слизистой оболочки кишечника. Культивируемый в клетках эпителия кишечника штамм *L. casei rhamnosus* Lcr 35, блокировал колонизацию кишечными патогенами [62, 131, 157, 186, 238].

Лактобациллы способны оказывать влияние на иммунную систему за счет стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов, синтезе интерферонов [54, 62, 156, 178, 179, 195].

Способность лактобацилл утилизировать флавопротеины приводит к образованию избыточного количества перекиси и истощению каталаз каталазозависимых микроорганизмов, угнетая их рост.

В норме лактобациллы образуют БАВ: лактозидин, лактолин, лейтелин, лизоцим, плантарицин [16].

Известно, что некоторые штаммы рода *Lactobacillus* могут выделять антимикробные вещества, участвующие в выработке бактериоцинов – особых антибиотикоподобных веществ, спектр действия которых не распространяется на родственные виды или относительно узок. В виду того, что антагонизм лактобацилл имеет много факторов, его спектр можно определить, основываясь на действии уже стандартизованных бактериоцинов [89].

Среди лактобацилл *L. acidophilus* имеет особое значение, именно его дефицит приводит к развитию бактериального дисбиоза.

При лечении гастритов у пациентов, получавших пробиотики *L. acidophilus*, отмечали высокую частоту эрадикации *H. pylori*. В то время как в опытах с *L. gasseri* OLL2716 (штамм LG21) уменьшалось воспаление слизистой желудка и содержание выдыхаемого <sup>13</sup>C при уреазном тесте, однако в биопсийном материале эрадикация *H. pylori* не имела подтверждения [140, 208, 222, 223, 238, 251].

Для профилактики и лечения острой диареи, вызванной диарогенными бактериями, в частности ETEC и *Salmonella/Shigella* (80% с установленной этиологией) было изучено большое количество различных пробиотических

штаммов. *L. acidophilus* (helveticus TSH) NK 1 имеет высокую антагонистическую активность против *E. coli* и *K. pneumoniae*, *S. sonnei* и *P. aeruginosa*, с диаметром угнетения роста от 36 до 50 мм. Против дрожжеподобных грибов рода *Candida* лактобациллы неактивны [27, 132, 143, 222, 232, 239, 250].

Франческо Савино и соавторы обнаружили дефицит лактобацилл у детей с коликами, при этом количество анаэробных грамотрицательных микроорганизмов значительно превышало норму. Лечение пробиотиком с *L. reuteri* в течение 7 по 10<sup>6</sup> привело к облегчению симптомов у 95% младенцев [130, 220, 223].

Известно, что *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG предотвращают обострения язвенного колита, вызванного *C. difficile* [4, 45, 46, 153, 229, 245].

Для профилактики и лечения заболеваний пищеварительного тракта, дыхательных путей, инфекциями мочеполовой системы широко используются препараты живых или убитых лактобактерий, их автолизаты и метаболиты.

Спектр положительного влияния молочнокислых бактерий постоянно расширяется. Препараты лактобацилл применяют как антиоксиданты против пероксидаз липидов и стимулирующих рост нормальной микрофлоры кишечника. *L. acidophilus* способны увеличивать синтез секреторного IgA более чем в 4 раза; предотвращают возникновение диареи, на фоне антибактериальной терапии [174].

### 1.3 Грибы рода *Trichoderma* – продуценты БАВ

Грибы рода *Trichoderma* широко распространены в природе и играют ключевую роль в сообществе микромицет. Они обладают высокой скоростью роста, неприхотливы и легко культивируются как в лабораторных, так производственных условиях. Известно, что мицелиарные грибы, характеризующиеся апикальным ростом, демонстрируют рекордные показатели прироста биомассы (за минуту гифа удлиняет свой конец в пределах 100 мкм). По данным молекулярно-генетической экологии рода установлено присутствие микромицета 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, включающие

некоторые формы сочетанного микопаразитизма с условно-патогенной микрофлорой [3, 183, 191] (рисунок 1).

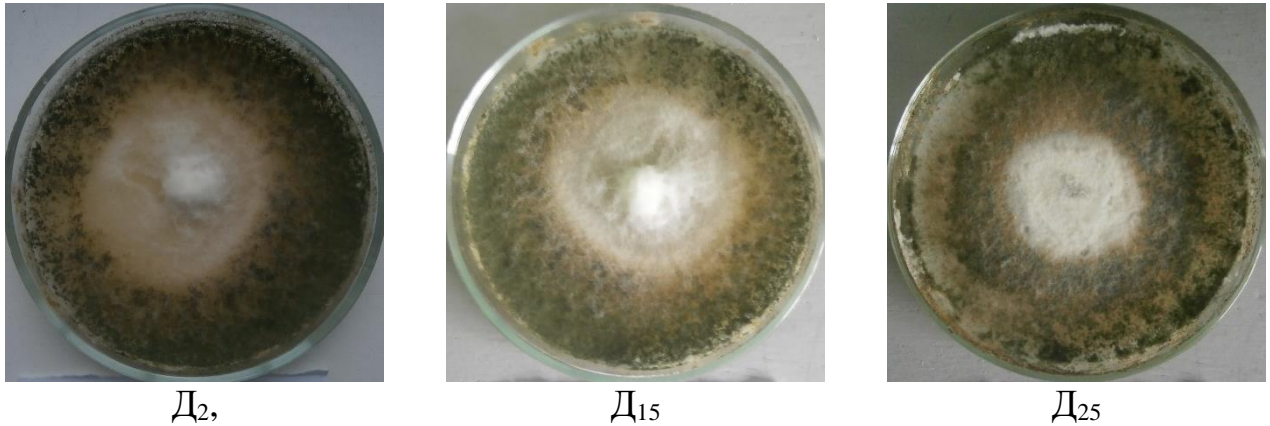


Рисунок 1. *Trichoderma harzianum* Rifai, коллекция кафедры микологии и альгологии МГУ имени Ломоносова, предоставленные д.б.н., проф. Александровой А. В.

Грибы рода *Trichoderma* spp. имеют большой интерес, являясь источником БАВ – перспективных компонентов для создания лекарственных биопрепаратов. Имея высокий антагонистический потенциал, их широко используют для разработки антибиотических препаратов по всему миру. В опытах *in vivo* и *in vitro* выявлен целый спектр экзометаболитов с антифунгальным и антибактериальным действием. Грибы рода *Trichoderma* широко используются в сельскохозяйственном производстве, их область применения распространяется на ветеринарию, растениеводство, фармацевцию. [194, 207, 221].

Грибы *Trichoderma* spp. синтезируют свыше 180 метаболитов, включающие различные классы химических соединений, в том числе и биологически-активные вещества, представляющие интерес для фармакологической промышленности [23, 36, 49, 56, 74, 207].

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 защищающие 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. Механизм действия веществ с биологической активностью, особенно связанный с терапевтическими свойствами остается мало изученным [252, 255, 258].

Особое место среди вторичных метаболитов гриба имеют БАВ, обладающие выраженным антагонизмом против родственных и/или чужеродных микробов [35, 236].

Вайндлинг впервые описал получение антибиотических БАВ из грибов *Trichoderma* spp. [266]. Их повсеместно применяют в биоконтроле возбудителей инфекций сельскохозяйственных растений [183, 212, 259]. Для плантационных культур чаще всего используется штамм *Trichoderma harzianum* – зерновые, овощные, плодовые культуры [168, 175, 202, 241].

В последнее время стало развиваться направление исследований, связанное с изучением пептаиболов. Пептаиболы – это класс антибиотиков, нерибосомального происхождения, имеющих полипептидную структуру, в составе которой присутствуют непротеиногенные аминокислоты. Для них характерно наличие N-ацетилированных концов и C-концов аминспиртов. Пептаиболы обладают сильной активностью против ряда грибов и бактерий. Их антимикробная активность связана со способностью повреждать мембраны, приводящей к нарушению осмоса и гибели клетки [92].

Потенциальная сфера использования *Trichoderma* spp. – промышленное производство ферментов, антибиотиков и других ценных метаболитов (рисунок 2) [241].

Эти коротко-цепочечные пептиды широко рассматриваются в качестве претендентов на использование в лекарственных препаратах для лечения заболеваний, вызванных микроорганизмами с множественной резистентностью к антибиотикам [69, 167, 170, 210].

Штамм *T. pseudokoningii* SMF2 синтезирует трихононины, активные против *Fusarium oxysporum*. *T. polysporum* синтезирует трихоспорины В-VIIa и В-VIIb,

активные против *Trypanosoma brucei*.

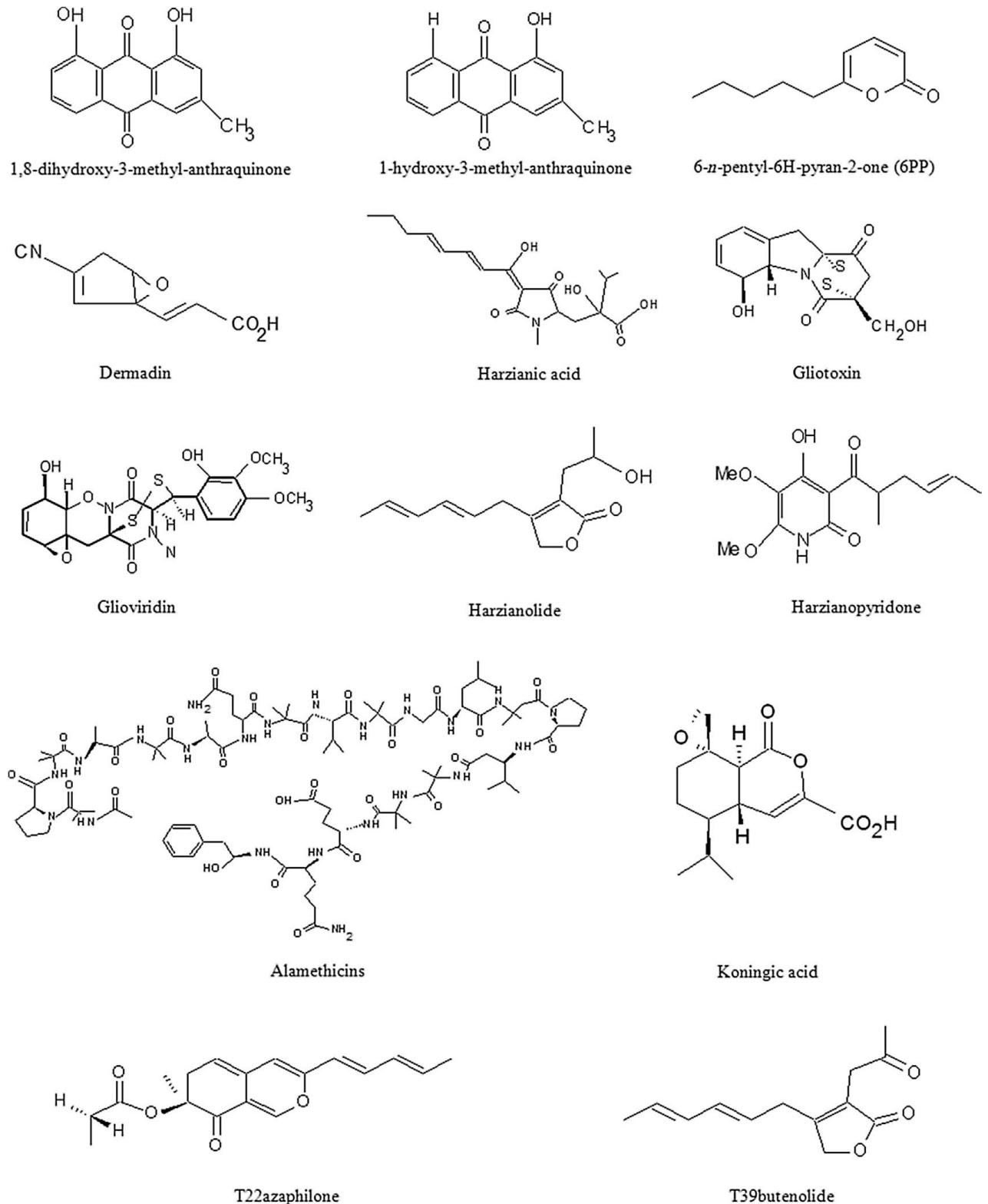


Рисунок 2 - БАВ, продуцируемые *Trichoderma* spp. [191]

*T. artroviride* и *T. viride* штамм 63 синтезируют трихозеанин и сузуказилин А, активные против MRSA – метициллинрезистентных золотистых стафилококков (таблица 3) [181, 206, 265].

Таблица 3. Классификация пептаиболов и их продуценты [69]

продуцент	пептиды / подгруппы	
	<i>Trichoderma atroviride</i> Bissett. 1984	Атровиридины
Неоатровиридины		2
<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. and Nirenberg. 1999	Трихотоксин	3
<i>Trichoderma viride</i> Pers. 1794	Триходеценин	4
	Сузукациллин	5
	Аламетицин	6
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai. 1969	Трихокиндины	7
	Трихорзин	8
	Харзианины	9
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem. 1902	Трихоконины	10
	Триконингины	11
<i>Trichoderma saturnisporum</i> Hammill. 1970	Парацельзин	12
	Сатурниспорины	13
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai. 1969	Лонгибрахины	14
	Трихогин	15
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai. 1969	Трихоспорины	16
	Циклоспорины	17, 18
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai. 1969	Псевдоконины	19
<i>Trichoderma reesei</i> E.G. Simmons. 1977	Парацельзины	20

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 и Зарубежной научной 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 перспективным.

#### **1.4 Пробиотики для коррекции микробиоценоза кишечника**

В настоящее время состояние микробиоценоза кишечника имеет большое значение как критерий диагностики прогноза патологических состояний у человека и животных [22, 30, 51, 141].

Лечение дисбактериоза желудочно-кишечного тракта представляет собой комплекс средств, включающий коррекцию моторно-секреторных функций, контролирующую всасывание и защиту кишечника, селективную дезактивацию патогенной микрофлоры, коррекцию нативной микрофлоры и функциональное питание [139].

Применение препаратов на основе живых микроорганизмов является наиболее изученным и эффективным методом поддержания микробиоценоза кишечника на оптимальном уровне. Пробиотики, направленные на коррекцию микробиома, используют БАВ нормальной микробиоты, в частности лактобацилл и

бифидобактерий [145].

Для изменения количественного соотношения некоторых бактерий и/или подавления роста условно-патогенных микроорганизмов, при их избытке основным средством служат пробиотики. Их применение не имеет альтернативы, когда у пациента отягощен аллергологический анамнез, при беременности и в случае резистентности возбудителя к антимикробным препаратам. Описаны случаи, когда бактериальные пробиотики с высоким антагонизмом использовали в лечении локальных гнойно-воспалительных процессов [190].

С древних времен известно, что кисломолочные продукты не только хорошо усваиваются организмом, но и предотвращают развитие болезней органов пищеварения. Достоверно установлено, что при применении лактобактерий для коррекции микрофлоры кишечника организма процесс выздоровления после многих инфекций ускоряется значительным образом. В последние десятилетия стали особенно популярными пробиотические продукты для профилактики и лечения определенных заболеваний желудочно-кишечного тракта [128].

Проявление биологической активности полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта носит локальный характер, а их воздействие на другие органы и ткани является опосредующим [31, 141].

Механизм антагонистического действия облигатных микроорганизмов желудочно-кишечного тракта на патогенную и условно-патогенную микрофлору на сегодняшний день до конца не установлен. Однако основными явлениями считаются: борьба за источники пищи и пищевые ресурсы, физические и химические изменения в среде обитания, вызванные сосуществованием определенных полезных микроорганизмов по отношению ко вредным, высвобождение антибиотикоподобных веществ. Также внутриклеточные и внеклеточные метаболиты аутологических микроорганизмов способны ингибировать активность ферментных систем условно-патогенных бактерий [67, 21, 141] (таблица 4).

Таблица 4. Классификация пробиотических препаратов

№	группа	состав	препарат
1	монокомпонентные	1 штамм бактерий бифидосодержащие лактосодержащие колисодержащие	Ацилакт Лактобактерин Колибактерин Мутафлор
2	поликомпонентные (симбиотики)	несколько штаммов бактерий одного или разных видов, синергетики	Бификол Линекс
3	комбинированные (синбиотики)	комбинация пробиотиков и пребиотиков (добавки, которые способствуют выживанию и усиливают действие пробиотиков)	Бифиформ Бифиформ Полибактерин Бифидумбактерин форте
4	рекомбинантные (генно-инженерные)	на основе генно-инженерных штаммов микроорганизмов	Субалин
5	самоэлиминирующиеся антагонисты (спорообразующие)	не свойственные биотопы, самоизолирующиеся микроорганизмы рода Bacillus	Бактисубтил Биоспорин
6	сорбированные	иммобилизованные на сорбенте живые бактерии	Пробифор Бифидумбактерин форте Флорин форте
7	метаболические	продукты жизнедеятельности пробиотических бактерий	Хилак форте
8	мультипробиотики	более 7 симбиотических штаммов бактерий	Симбитер-2 Пробиз Фемина

В настоящее время современному уровню знаний наиболее соответствуют следующие определения пробиотиков – это живые микроорганизмы и вещества микробного или иного происхождения, которые оказывают благотворное влияние

на физиологические функции, биохимические и поведенческие реакции организма хозяина посредством оптимизации его микрoэкологического состояния [155].

Пробиотические микроорганизмы благоприятно воздействуют на организм, способствуют формированию полноценного барьера на слизистой оболочке кишечника, предотвращающего прикрепление патогенных форм микроорганизмов и регулирующего защитные механизмы организма, улучшая баланс кишечной микрофлоры. Доказано, что эти микроорганизмы оказывают положительное влияние на эпителиальные рецепторы и субстраты, синтез антимикробных факторов, а также формирование иммунологически созданного защитного барьера кишечника, который конкурирует с другими бактериями за подкисление слизи [177, 205, 247].

Пробиотические препараты относятся к высокоэффективным лечебно-профилактическим средствам, в основе которых лежит использование представителей индигенной микробиоты (лактобациллы, бифидобактерии и т.д.). Область применения пробиотиков включает коррекцию микробиоценоза кишечника, а также иммунной, эндокринной и т.д., в том числе энзимопатии. Высокую эффективность показали препараты на основе лактобацилл и бифидобактерии. Их применение весьма перспективно при дисбиотических расстройствах на фоне острых кишечных инфекций [5, 9, 14, 22, 80, 171, 203].

Восстановление и коррекция дисбиотических нарушений, зависит от локализации, степени тяжести заболевания и выраженности клинических проявлений [15, 18, 28, 88, 193, 216, 246].

Однако препараты на микроорганизмах, оказывающие благотворное влияние на состояние энтеробактерий, не относятся к пробиотикам. Поэтому А.И. Калмыкова определяет пробиотики как препараты микробного происхождения, которые оказывают положительное косвенное воздействие на макроорганизмы посредством регуляции микрофлоры кишечника [59].

В современной гастроэнтерологии для восстановления нарушенной микрoэкологии биотопа используются 8 групп пробиотических препаратов

(таблица 5) [1, 64].

Таблица 5. Терапевтические эффекты пробиотических препаратов

Пищеварение и функциональное состояние ЖКТ	Поддержание и улучшение состояния слизистой оболочки ЖКТ	Пребиотики
	Контроль функциональных свойств кишечной иммунокомпетентной лимфоидной ткани	Пробиотики, пребиотики, синбиотики
	Обеспечение образования и ассимиляции короткоцепочечных жирных кислот	Пребиотики, синбиотики
Моторно-эвакуаторная функция кишечника	Уменьшение времени транзита пищевой массы	Пищевые волокна
	Обеспечение формирования стула	Пищевые волокна
Кишечная микрофлора	Восстановление микроэкологии (увеличение популяции и видового состава нормальной микрофлоры)	Пробиотики, синбиотики
	Избирательная стимуляция роста и (или) биологической активности нормальной микрофлоры	Пребиотики, синбиотики

Эубиотики – препараты, содержащие живые непатогенные и нетоксичные микроорганизмы в количестве достаточном, для сохранения жизнеспособности и активности на пути через ЖКТ к постоянной локализации через пищеварительный тракт и при хранении. Препараты на основе этих микроорганизмов не относятся к лекарственным средствам, но широко используются в качестве БАД, а также в составе кисло-молочных продуктов, т.к. оказывают положительное влияние на пищеварение.

Также не вызывает сомнения тот факт, что микроорганизмы, содержащиеся в пробиотических препаратах, ослабляют интенсивность своего роста и присущие им функции, попадая в патологически измененный желудочно-кишечный тракт или под воздействием факторов, неблагоприятных для их роста и развития [137,

200, 201]. Поэтому в лечении используют типы препаратов, называемых пребиотиками, для повышения выживаемости и стимуляции биологической активности микрофлоры [138].

Пребиотики - неспецифические средства, которые оказывают влияние на биологические процессы в организме человека и животных. Они являются продуктами биосинтеза и подразделяют на первичные (витамины, жиры, углеводы, белки и т.д.) и вторичные (алкалоиды, гликозиды, дубильные вещества и т.д.) [3, 169, 202, 242, 249].

Обычно эти БАВ не расщепляются гидролазами и не адсорбируются в проксимальных отделах ЖКТ, зато в дистальных отделах метаболизируются микробиотой кишечника (фруктозо-олигосахаридах, галакто-олигосахаридах, инулине, лактулозе). Источниками пребиотических БАВ является различное сырье природного происхождения (морепродукты, микроорганизмы, животные, растения и т.д.) [5, 61, 217, 234].

В растительном сырье присутствует комплекс из множества БАВ, однако лечебным действием обладает крайне малое количество. Такие компоненты называются «действующими», их используют для создания лекарств. Остальные компоненты – «сопутствующие», они так же являются продуктами первичного и/или вторичного биосинтеза [69, 224]. Среди них выделяют полезные, т.е. способны усиливать эффект действующего вещества на организм человека (витамины, минеральные вещества, флавоноиды) и вредные (рицин, не окисленные гликозиды). Удалить эти вещества можно при термической обработке или при хранении в течение одного года [3].

Кроме действующих и сопутствующих в сырье выделяют фармакологически индифферентную группу «балластных» веществ. Это условное понятие, так как и эти вещества являются продуктами первичного синтеза и влияют на организм человека и животного, к ним относятся пищевые волокна, в частности клетчатка. Пищевые волокна обеспечивают удаление бактериальных отложений в ротовой полости, регуляцию аппетита, уменьшение усвоения жиров, поддержание в крови уровня триацилглицеролов, холестерина,

липопротеинов высокой и низкой плотности, поддержание уровня глюкозы в крови, снижение адсорбции аллергенов в кишечнике, устойчивость к онкологическим патологиям [47, 87, 133].

Минеральные компоненты растительного сырья разделяют на микроэлементы и макроэлементы [135, 267].

Синбиотики – получают при сочетании пробиотических макроорганизмов с питательными веществами пребиотика. Дополнительно такие препараты могут быть дополнены витаминами, аминокислотами и другими полезными БАВ для роста и размножении микроорганизмов. Так же возможно использование сорбентов в качестве носителя компонентов, одна сорбент способен выполнять и непосредственно дезинтоксикационную функцию, что незаменимо при терапии расстройств пищеварения на фоне отравлений. Этим препаратам характерна избирательность действия [81; 82; 148, 234, 254, 260].

Симбиотики – представляют собой комбинацию групп пробиотических микроорганизмов одного или нескольких видов. [2; 73, 79, 86, 161, 188, 191, 213].

Метабиотики – препараты, не содержащие живых микроорганизмов, в их основу входят только продукты жизнедеятельности или компоненты клеток продуцентов. Такая форма обеспечивает гораздо большую доступность БАВ. Некоторые продуценты выделяют БАВ низкого молекулярного веса (LMW), способные избирательно подавлять рост условно-патогенных микроорганизмов, в то же время, оказывая стимуляцию роста собственного биотопа кишечника. Такие метаболиты легки в получении, устойчивы к воздействию пищеварительной системы и могут быть использованы для создания продуктов функционального питания, лечебно-профилактических препаратов [182, 248, 256, 264].

В процессе своей жизни микроорганизмы пищеварительного тракта, выделяют различные вещества, которые могут быть как промежуточными, так и конечными звеньями метаболизма. В микробных популяциях пищеварительного тракта постоянно идет процесс горизонтального или вертикального переноса генетического материала, в результате микроорганизмы приобретают гены,

которые несут информацию о новых БАВ. При трансформации субстратов, выделяемых клетками кишечника

Среди компонентов и метаболитов симбиотических микроорганизмов (прежде всего, лактобацилл, бифидобактерий, бактероидов, кишечных палочек, бацилл и некоторых других) наиболее изученными по своим потенциальным биологическим эффектам являются короткоцепочечные жирные и желчные кислоты, метаболиты холина, различные производные фенола, бензола и фенила, дериваты индола, витамины, полиамины, липиды, ферменты и другие белки, аминокислоты [31, 53, 103], катехоламины и другие нейромодуляторы [15, 63], газовые молекулы [27, 53] и некоторые другие [53, 103].

Молекулярной мишенью для микробных БАВ являются рецепторы эпителиальных клеток: поверхностные, мембранные, цитоплазматические, митохондриальные и ядерные. При их взаимодействии происходит индукция различных генов, отвечающих за поддержание стабильности генома и микрогенома, а так же редактирующих эпигеномную программу развития и реализации, обеспечивающих внутри- и межклеточный информационный обмен и взаимодействие между микроорганизмами и хозяином. БАВ, синтезируемые представителями индигенной микробиоты, вызывают как локальные, так и системные эффекты через нейроэндокринные, иммунные, метаболические и эпигенетические механизмы [158].

### **1.5 Применение пробиотиков в ветеринарной медицине**

Одной из основных проблем ветеринарной практики и животноводстве являются незаразные болезни молодняка сельскохозяйственных животных [69]. В первые дни жизни наиболее часто регистрируют заболевания желудочно-кишечного тракта. Из незаразных заболеваний молодняка до 10-дневного возраста они составляют 60-90%. Это обусловлено несовершенством естественной защиты организма к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, а также некорректным содержанием и кормлением в животноводческих комплексах. Полиэтиологическая диспепсия, составляет 80%-



95% среди болезней ЖКТ, имеет сложную диагностику и лечение, часто сопровождается иммунодефицитами, в связи, с чем регистрируется высокая летальность 15-70%. Иммунопатологии имеют лидирующие позиции среди сопутствующих заболеваний в ранний период жизни, особенно при реорганизации хозяйств в животноводческие комплексы промышленного уровня с высокой концентрацией поголовья. При этом наблюдается снижение резистентности организма, что является одним из главных факторов патогенеза заболеваний органов пищеварения у молодняка. В данном случае перспективным направлением является повышение неспецифической резистентности молодняка за счет схем лечения, включающих применение пробиотических препаратов [33, 55, 58, 90, 173, 230].

Для лечения болезней ЖКТ предложено много схем лечебных мероприятий, однако из-за высокой заболеваемости и падежа не удастся достигнуть полной сохранности молодняка, а также избежать снижения племенной ценности и продуктивных качеств животных, что наносит ущерб животноводству. Лечебно-профилактические мероприятия для нормализации микробиоценоза кишечника после антибактериальной терапии являются актуальной задачей для повышения показателей эффективности производства и качества конечного продукта. Это приводит к оздоровлению всего организма в целом и снижению микробизма окружающей среды [26, 60, 75, 141, 182, 182].

На мировом рынке ветеринарных препаратов 95% - препараты для птиц, т.к. птицеводство перешло к промышленному производству одним из первых из отраслей сельского хозяйства. На микробиоценоз кишечника птицы положительное действие оказывают высоко доступные препараты нового поколения, к которым относят пробиотики: пребиотики, эубиотики, синбиотики, симбиотики. Фуллер рассматривал пробиотики как живой микробный корм, он оказывает благотворное воздействие на животных-хозяев, улучшая микробный баланс кишечника. Он придавал большое значение живым микробным клеткам, содержащимся в пробиотических препаратах [3, 27, 61, 64, 152, 219, 230, 239, 261].

В ветеринарии пребиотики находят все более широкое применение в качестве добавок в рацион для кормления животных, птиц, насекомых, т.к. улучшают качество кормового продукта, оказывают антимикробное, сорбционное, антиоксидантное воздействие, стимулируют иммунитет. БАВ, обладающие способностью воздействовать на иммунную систему, делятся на экзогенные – вещества микробного происхождения (бактериального и грибного) и эндогенные – иммунорегуляторные пептиды и цитокины (интерлейкины, монокины и интерфероны) [5].

Таким образом, согласно представленному литературному обзору показано, что применение пробиотиков, пробиотикосодержащих препаратов, синбиотиков является мощным резервом в поддержании гомеостаза макроорганизма и, как следствие, повышении жизнеспособности человека и животных на различных этапах постнатального онтогенеза.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось в условиях ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии», «Инновационный научно-исследовательский испытательный центр коллективного пользования» ФГБОУ ВПО «Орловский ГАУ», ФКП «Орловская биофабрика», МЛПУЗ «Городская больница имени С.П. Боткина» (г. Орел) в период с 2012 по 2023 гг.

### 2.1 Объекты исследования

Культуры грибов рода *Trichoderma*, предоставленные доктором биологических наук, профессором кафедры микологии и альгологии МГУ имени Ломоносова д.б.н., проф. Александровой А. В. – *T. harzianum* Rifai: Д<sub>2</sub>, Д<sub>15</sub>, Д<sub>25</sub>, Б/л 14, Б/л 18, Б/л 20.

Контрольные культуры из каталога «Culti-Loops Organisms» (Thermo Scientific, США) *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Candida albicans* ATCC 10231, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *H. alvei* ATCC 11604, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 27736, *Proteus vulgaris* ATCC 49132, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* ATCC 13076, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715.

Субстанции антибиотиков (Sigma-Aldrich, Германия): амоксициллин безводный CAS 26787-78-0, меропенем тригидрат 119478-56-7. цефазолина натриевая соль CAS 27164-46-1, ципрофлоксацина гидрохлорид CAS 86393-32-0.

### 2.2 Реактивы и расходные материалы

Ацетонитрил (Panreac, Испания); Аммоний хлористый (ГОСТ 3773-72); Среда ГМФ-агар, Среда ГМФ-бульон, Набор для окраски по Граму (ОАО «НИЦФ», РФ); Sorbifil (ООО «ИМИД», РФ); Вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72); Глюкоза (ГОСТ 6038-79); Гидролизат казеина (ТУ9385-005-39484474-2003); Диски из фильтровальной бумаги (ГОСТ 12026-76); Железо сернокислое

(ГОСТ 4148-78); Калий азотнокислый (ГОСТ 4217-77); Натрий азотнокислый (ГОСТ 4168-79); Калий фосфорнокислый однозамещенный (ГОСТ 4198-75); Калий фосфорнокислый двузамещенный (ГОСТ 2493-75); Калий хлористый (ГОСТ 4568-95); Кислота серная (ГОСТ 4204-77); Кислота уксусная (ГОСТ 61-75); Кислота хлороводородная (ГОСТ 3118-77); Магния сернокислый 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); Натрий азотнокислый (ГОСТ 4168-79); Натрий хлористый (ГОСТ 4233-77); Натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77); Водорода перекись (ГОСТ 177-88); Сахароза (ГОСТ 5833-75); 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); D-мальтоза, Декстрин, Основа кровяного агара (Himedia, Индия); Пептон (ГОСТ 13805-76).

### 2.3 Оборудование

Анаэростат «АЭ-01» (НИКИ МЛТ, Россия); Денситометр «Densi-la-metr» (Erba, Чехия); дезинтегратор ультразвуковой «Soniprep 150» (MSE, Великобритания); анализатор биохимический «EOS BRAVO PLUS» (Hospitex diagnostix, Италия); инкубатор CO<sub>2</sub> «8000 WJ» (Thermo Scientific, США); устройства для промывки планшет «WellWash» (Thermo Electron, Германия); фотометр планшетный «Multiskan EX» (Thermo Electron, Германия); иономер «PP-25» (Sartorius, Германия); весы аналитические «LA230S» (Sartorius, Германия); испаритель ротационный «ИР-1-ЛТ» (Лабтех, Россия); центрифуга «SR 16» (Thermo Scientific, США); сушка лиофильная «Netto Power Dry LL3000» (Thermo Fisher Scientific, Чехия); шейкер термостатирующий «ST3» (ELMI, Латвия); спектрофотометр «СФ 56» (ЛОМО, Россия); ферментер «Minifors» (Infors, Швейцария); ферментер «Biostat A» (Sartorius, Германия) анализатор бактериологический «VITEK®2 Compact» (bioMérieux, Франция); прибор «ПТП-М» (ЛОИП, Россия); рефрактометр «RE50» (Mettler Toledo, Германия).

## 2.4 Методы исследования

*Тестирование на антагонизм.* Получение агаровых блоков. Блоки с диаметром 6 мм получали вырезанием из агара, несущего недельную культуру продуцента, посеянную газоном. Брли инсулиновый шприц, отрезали конец с канюлей, полученный срез затачивали с внешней стороны, по кругу.

*Получение экстракта биомассы.* Биомассу продуцента отделяли от питательной среды седиментационным методом, для чего культуральную жидкость центрифугировали 10 минут с частотой вращения  $5000 \text{ мин}^{-1}$ , и трижды отмывали физиологическим раствором с повторным центрифугированием. Осадок ресуспендировали в буферном растворе и гомогенизировали в ультразвуковом дезинтеграторе за 15 циклов в интервальном режиме: 20 секунд импульса, 10 секунд паузы, обеспечивая постоянное охлаждение за счет кюветы, снабженной проточным охлаждением; частота колебаний звуковода 23 КГц, амплитуда 15  $\mu\text{м}$ . Экстракт биомассы и культуральную жидкость продуцента очищали центрифугированием в течение 10 минут с ускорением  $10000g$ , супернатант использовали для постановки теста.

*Постановка теста.* Наличие антагонизма между продуцентом и культурой тестируемого микроорганизма устанавливали, воспроизводя стандартный дискодиффузионный метод, заменив бумажный диск агаровым блоком. Результат оценивали согласно оригинальной методике.

Тестируемую культуру суспендировали в ГМФ-бульоне, добавляли очищенные от продуцента экстракт биомассы или культуральную жидкость в соотношении 1:1, инкубировали 24 часа на термостатируемом шейкере с частотой орбитального встряхивания  $200 \text{ мин}^{-1}$ , при температуре  $35^\circ\text{C}$ . Результат оценивали турбидиметрически по приращению оптической плотности реакционной смеси, относительно отрицательного контроля на планшетном фотометре вертикального сканирования Multiskan EX в двухволновом режиме, 405/620 нм.

*Определение биохимических свойств микроорганизма* на мультисубстратной тест-системе. Изолят исследуемой культуры пересеивали на кровяной агар и

инкубировали 72 час при 28 °С. В специальной пробирке из полистирола готовили гомогенную суспензию исследуемой культуры с плотностью от 1,80 до 2,20 по McFarland в 3,0 мл 0,45–0,50 % водного раствора NaCl, pH 4,5–7,0. Пробирку с суспензией и карту из набора «VITEK 2 ID-YST» помещали в кассету анализатора VITEK® 2 Compact, и инициировали процедуру анализа.

*Подбор компонентов питательной среды.* Был реализован отсеивающий эксперимент, включающий исследование влияния одновременно 15 факторов и их взаимодействий. Факторы были распределены в 4 группы, представляющие собой: I – спирты –  $X_{1,2}$ ; II – дисахариды –  $X_{3-6}$ ; III – моносахариды –  $X_{7-9}$ ; IV – органические кислоты –  $X_{10-15}$ . Параметром оптимизации  $Y$  был выбран диаметр колонии гриба, измеренный на 5-7 сутки инкубации при поверхностном культивировании на плотных питательных средах. Для реализации эксперимента *in vitro* получали матрицу сверхнасыщенного плана методом случайного баланса. В каждой группе формировали индивидуальный план по правилам полного факторного эксперимента, затем случайным образом комбинировали строки (таблица 6). Если фактор влияет на выходной параметр  $y_i$ , то при переходе его с одного уровня на другой произойдет смещение центра распределения. Вклад фактора оценивали с помощью разницы медиан для нижнего и верхнего уровня. Числовое значение коэффициентов определяли как разность средних значений отклика, соответствующих верхнему и нижнему уровням фактора (формула 1):

$$b_i = \frac{\sum \bar{Y}_{X_i^+}}{N_{(X_i^+)}} - \frac{\sum \bar{Y}_{X_i^-}}{N_{(X_i^-)}} \quad (1)$$

Корректировку экспериментальных данных проводили только по нижнему уровню варьирования факторов, выбирали значения отклика функции  $\bar{y}_i$ , которые соответствуют уровню этих факторов (формула 2):

$$S^2_y = \frac{1}{N(m-1)} \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2 \quad (2)$$

Дисперсию воспроизводимости среднего значения  $S^2_{\bar{y}}$  определяли на основании постановки серии из 9 параллельных опытов со значениями  $X^0_j$ . Значение рассчитывали по формуле 3:

Таблица 6. Матрица отсеивающего эксперимента

№	X <sub>1</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>10</sub>	Порядок опытов по группам				Условия эксперимента														
	X <sub>2</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>11</sub>					I		II				III			IV					
		X <sub>5</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>12</sub>	I	II	III	IV	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>
		X <sub>6</sub>		X <sub>13</sub>					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>
				X <sub>14</sub>					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>
				X <sub>15</sub>					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>
1	-1	-1	-1	-1	10	7	6	8	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
2	1	-1	-1	-1	6	3	9	3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	3	13	16	4	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1
4	1	1	-1	-1	16	16	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	12	2	4	9	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	15	9	3	8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1
7	1	-1	-1	1	14	2	16	16	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	-1	1	16	3	4	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	5	6	9	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	9	12	10	9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
11	-1	1	-1	1	7	13	10	7	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
12	1	1	-1	1	13	7	4	8	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1
13	-1	-1	1	1	2	9	15	9	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
14	1	-1	1	1	8	12	6	12	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	4	3	5	11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	11	6	5	6	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1

$$S^2_{\bar{y}_0} = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m (y_{0i} - \bar{y}_{0i})^2 \quad (3)$$

Процедуру корректировки отклика останавливали при исключении всех влияющих факторов, т.е. достижении значения дисперсии воспроизводимости, соразмерного дисперсии среднего значения отклика функции, откуда рассчитывали значение критерия Фишера (формула 4):

$$F_{\text{расч}} = \frac{S^2_y}{S^2_{\bar{y}_0}} \quad (4)$$

*Количественное определение общего содержания углеводов [185].* Реакционная смесь содержала 1 часть экстракта биомассы, 1 часть 5% раствора фенола и 5 частей концентрированной серной кислоты. Пробы перемешивали, инкубировали 15 минут при температуре +10°C. Измеряли оптическую плотность при 488 нм против контрольного образца. Концентрацию в пробах определяли по стандартной калибровочной кривой.

*Количественное определение сахарозы и редуцирующих веществ [29, 154].* В мерной колбе соединяли 10 частей образца и 1 часть HCl<sub>конц.</sub> ( $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1,188$ ) инкубировали 8 минут при температуре 68-70 °С, с перемешиванием, охлаждали до 20°C. Реакционную смесь нейтрализовали 20% раствором NaOH, контролируя процесс по индикаторной бумаге, доводили водой до метки. В полученном растворе определяли содержание редуцирующих веществ. Концентрацию сахарозы рассчитывали по формуле 5:

$$C_{\text{сах}} = (C_{\text{и}} - C_0) \times 0,95 \quad (5)$$

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

*Получение бактериостатических метаболитов.* Приготовление инокулята продуцента. Из недельной агаровой культуры 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 °С.

*Глубинное культивирование.* Реактор готовили к работе в соответствии с его инструкцией по эксплуатации. Среду стерилизовали, устанавливали параметры



культивирования. Культивирование проводили при заданных условиях с момента инокуляции до расчетного времени. В процессе работы ферментера осуществляли постоянный контроль и корректировку температуры рН, перемешивания и аэрации, поддерживая значения на установленном уровне. Согласно инструкции, датчик  $pO_2$  калибровали после стерилизации по 1 точке на 100%  $O_2$  при 180 об/мин, 5 л/мин. Датчик рН калибровали заранее, по 2 точкам.

*Выделение антимикробных соединений.* Полученную культуральную жидкость очищали от биомассы продуцента, соединяли с экстрагентом, отстаивали до разделения и отбирали органический слой.

*Концентрирование антимикробных соединений.* Целевой продукт отделяли от экстрагента на ротационном испарителе в щадящем режиме, количественно переносили в ампулы и лиофильно высушивали согласно программе сушки. Из остатка готовили стандартный раствор в 96% этаноле.

*Оптимизация условий культивирования [169].* Был реализован метод Бокса – Уилсона, включающий полный факторный эксперимент Гаусса – Зейделя и оптимизацию по типу крутого восхождения. Параметром оптимизации  $Y$  был выбран диаметр зоны подавления роста тест-культуры. Факторами варьирования выбрали:  $X_1$  – посевную дозу продуцента, ед. мутности McF;  $X_2$  – время инкубации, сутки;  $X_3$  – концентрацию субстрата, г/л. Значения факторов и единицы варьирования представлены в таблице 7.

Таблица 7. Распределение уровней факторов

Уровень	Фактор		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$
	Посевная доза, ед. мутности McF	Продолжительность культивирования, сут.	Сахароза, г/л
$\min x_j$	1	1	15
$\max x_j$	2	7	30
$^0x_j$	1,5	4	22,5
$\Delta x_j$	0,5	3	7,5

Матрица планирования полного факторного эксперимента представлена в таблице 8.

Таблица 8. Матрица планирования ПФЭ по типу  $N = 2^k$ 

№	Фактор							
	$X_0$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1X_2$	$X_1X_3$	$X_2X_3$	$X_1X_2X_3$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1

Расчет крутого восхождения представлен в таблице 9.

Таблица 9. Расчет крутого восхождения

Уровень	Фактор		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$
Нижний, $\min x_j$	1	1	15
Верхний, $\max x_j$	2	7	30
Базовый, $^0x_j$	1,5	4	22,5
Интервал, $\Delta x_j$	0,5	3	7,5
Коэффициенты, $b_j$	-1,56	-1,73	-2,38
Пропорциональность, $\theta$	0,66	0,73	1
Шаг по градиенту, $\delta x_j$	0,51	3,78	17,84

*Определение чувствительности к антибиотическим препаратам и минимальной ингибирующей концентрации [93].* Диско-диффузионный метод реализовывали на плотной питательной среде готовили газон из 1 мл суточной тест-культуры 0,5 McF. Инкубировали 24 часа при 35° С, результат оценивали визуально. В микротитрационных планшетах готовили серийные разведения препаратов в жидкой питательной среде, инокулировали бактериальной взвесью, получая  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Инкубировали 24 часа при 35 °С с орбитальным перемешиванием 600 мин<sup>-1</sup>, результат оценивали денситометрически в двухволновом режиме 405/680 нм (+6 °С – контроль).

*Определение полноты извлечения.* Для определения оптимальных параметров, обеспечивающих полноту экстракции, ставили ряд экспериментов с варьированием объема этилацетата и продолжительностью взаимодействия с

культуральной жидкостью. Перемешивание осуществляли на магнитной мешалке, с частотой вращения якоря, обеспечивающей полное и равномерное взаимодействие водной и органической фазы. Результат оценивали по диаметру зон угнетения роста тест-культур, полноту экстракции выражали в %.

*Определение растворимости* [102]. Готовили разведения сухого экстракта культуральной жидкости в ряде растворителей, с соотношениями компонентов, указанными в таблице 10.

Таблица 10. Рабочие разведения сухого экстракта

Разведение	1:1	1:10	1:30	1:100	1:1000	1:10000
Препарат, г	1	0,1			0,01	
Растворитель, мл	1		3	10		100

*Подбор элюентов для ТСХ* [124]. За элементарные признаки принимали:  $X_1$  – диэлектрическая проницаемость ( $\epsilon$ );  $X_2$  – дипольный момент ( $\mu$ ), Д;  $X_3$  – растворимость экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (V), мл

*Выделение бактериостатических компонентов и определение их молекулярной массы* [107]. Экстракт культуральной жидкости разделяли на пластинах для ТСХ «Sorbifil» 2x20 см. За 2 см от края сорбента отмечали линию старта, в середину которой 5 раз наносили по 1  $\mu$ л препарата, высушивая до полного удаления растворителя. Пластины устанавливали в насыщенную хроматографическую камеру, экспозиция до конца сорбента. Наличие компонентов с бактериостатической активностью определяли биоавтографией. Полученные хроматограммы сушили, делили на полоски с заданными размерами и апплицировали каждую на газонную культуру тестируемого микроорганизма. Инкубировали 24 часа при 35°C, результат учитывали визуально, по зоне ингибирования роста тест-культуры, определяли  $R_f$  активной фракции.

Препаративно фракции получали колоночной гель-проникающей хроматографией. Колонка представляла собой цилиндр из боросиликатного стекла с внутренними размерами: длина 125 мм,  $\varnothing$  16 мм, объем = 25 мл (20° C), выходной торец заглушали стекловолокном и эпоксидной смолой, врезали феррулу и

подключали к магистрали. Сорбент запресовывали между слоями подготовленного песка\*, в качестве неподвижной фазы использовали декстрановый гель Sephadex G-15 размер частиц 40-120  $\mu\text{m}$ . Колонку заполняли элюентом до верхнего края сорбента, слой песка нагружали исследуемым анализом. Скорость потока 1 мл/мин при рабочем давлении 2,5 бар создавали плунжерным насосом (Labor Muszeripari Muvek Esztergom, Венгрия) с редуктором. Фракции отбирали вручную, по сигналу спектрофотометрического детектора от «Миличром-4». Изменение оптической плотности определяли при длине волны 240 нм, против элюента, объем измерительной кюветы и кюветы сравнения по 1  $\mu\text{l}$ . Молекулярную массу рассчитывали как среднее значение из отношений  $R_f$  фракции к  $R_f$  свидетелей с известной молекулярной массой.

\*Фракцию речного песка с диаметром частиц  $<0,35$  мм и соединяли с равным объемом концентрированной хлороводородной кислотой, интенсивно перемешивали, приливали 10 объемов дистиллированной воды и пропускали через бумажный фильтр на системе из воронки Бюхнера и колбы Бунзена, с подключением к вакууму. Отфильтрованный песок промывали деионизированной водой, переносили в емкость, куда снова добавляли кислоту. Процесс повторяли, пока свежая порция кислоты сохранит исходные свойства. Деминерализованный песок высушивали 1 час при 180  $^{\circ}\text{C}$ .

*Определение эффективности гомогенизации.* Для определения оптимальных параметров, обеспечивающих полноту эмульгирования препарата метаболитов в дисперсной среде, ставили ряд экспериментов с варьированием амплитуды колебаний звуковода и продолжительностью импульса. Эмульгирование производили в ультразвуковом дезинтеграторе, обеспечивая постоянное охлаждение за счет проточной кюветы, частота колебаний звуковода 23 кГц. Результат оценивали по диаметру зон угнетения роста тест-культур, полноту диспергирования выражали в %.

*Качественный анализ на чувствительности капельным методом.* На ГМФ-агаре соединяли каплю исследуемого препарата и каплю суточной бульонной культуры, стандартизованной по мутности 0,5 McFarland. Экспонировали в

продолжительности заданное количество минут и распределяли газоном на поверхности питательной среды. Результат учитывали визуально после суток инкубации при 35°C.

*Линейные зависимости* оценивали по уравнению, которое имеет общий вид:  $y = b \times x + a$ , где:  $y$  – аналитический отклик;  $x$  – фактор;  $b$  – угловой коэффициент, формула 6:

$$b = \frac{N \sum_{i=1}^N x_i y_i - \sum_{i=1}^N x_i \times \sum_{i=1}^N y_i}{N \sum_{i=1}^N x_i^2 - (\sum_{i=1}^N x_i)^2} \quad (6);$$

$a$  – свободный член, формула 7:

$$a = \frac{1}{N} \times (\sum_{i=1}^N y_i - b \sum_{i=1}^N x_i) \quad (7).$$

Экспериментальные данные, проведенные в трехкратной биологической и аналитической повторностях, обрабатывались в программе Microsoft Office Excel 2021.

### ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

#### 3.1 Скрининг антагонистически активных штаммов *Trichoderma* spp.

Спектр антагонизма штаммов рода *Trichoderma* определяли против представителей кишечного микробиоценоза: облигатных (*B. breve* ATCC 15700, *L. acidophilus* ATCC 4356), факультативных (*C. freundii* ATCC 8090, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *H. alvei* ATCC 11604) и патогенных (*C. albicans* ATCC 10231, *C. sporogenes* ATCC 11437, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *P. vulgaris* ATCC 49132, *S. enteritidis* ATCC 13076, *Y. enterocolitica* ATCC 23715). Эффективность исследуемых штаммов *Trichoderma* spp. оценивали по коэффициенту антибиотической активности. Восприимчивость тест-культур к исследуемым штаммам оценивали по коэффициенту чувствительности. Критерием выбора продуцента биологически активных веществ и тест-культуры был коэффициент наилучшего взаимодействия, выраженный отношением  $K_A$  и  $K_S$  (таблица 11).

В таблице 6 показано, что Грам+ бактерии, включая анаэробы, а также, гриб *C. albicans* ATCC 10231 не чувствительны к исследуемым штаммам *Trichoderma* spp.

Штаммы рода *Trichoderma* обладают антагонизмом в отношении Грам-микроорганизмов, проявляя слабый антагонизм с средним  $K_A$  10,81: *T. harzianum* Rifai Д 2 – 10,79; *T. harzianum* Rifai Д 15 – 10,8; *T. harzianum* Rifai Д 25 – 10,78; *T. harzianum* Rifai Б/л 14 – 10,91; *T. harzianum* Rifai Б/л 18 – 10,74; *T. harzianum* Rifai Б/л 20 – 10,82. По критериям оценки чувствительности, полученные результаты испытания Грам- тест-культур (включая контроли) в среднем относятся к категории «средняя чувствительность»,  $K_S$  16,19: *E. coli* ATCC 25922 – 19,06; *H. alvei* ATCC 11604 – 18,04; *K. pneumoniae* ATCC 27736 – 16,31; *P. vulgaris* ATCC 49132 – 13,87; *S. enteritidis* ATCC 13076 – 14,8; *Y. enterocolitica* ATCC 23715 – 15,12.

Таблица 11. Спектр антагонизма *Trichoderma* spp. и представителей кишечного микробиома

тест-культура →	<i>B. longum</i> ATCC 15708	<i>C. freundii</i> ATCC 8090	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>H. abei</i> ATCC 11604	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27739	K <sub>A</sub>
продуцент ↓	Ø зоны подавления роста Хср±ΔХ, мм												
<i>T. harzianum rifai</i> Д 2	6	6	6	6	18,89 ±0,34	6	16,78 ±0,55	15,44 ±0,5	6	14,78 ±0,88	13,67 ±0,89	13,89 ±0,91	10,79
<i>T. harzianum rifai</i> Д 15	6	6	6	6	18,44 ±0,41	6	16,89 ±0,53	14,44 ±0,5	6	15 ±0,4	14 ±0,4	14,78 ±0,55	10,8
<i>T. harzianum rifai</i> Д 25	6	6	6	6	18,44 ±0,5	6	18,11 ±0,53	14,78 ±0,62	6	14,67 ±0,63	12,89 ±1,11	14,44 ±0,41	10,78
<i>T. harzianum rifai</i> Б/л 14	6	6	6	6	18,89 ±0,53	6	17,67 ±0,49	15,33 ±0,7	6	15,44 ±0,82	13,89 ±0,41	13,67 ±0,34	10,91
<i>T. harzianum rifai</i> Б/л 18	6	6	6	6	18,67 ±0,28	6	18 ±0,63	14,44 ±0,57	6	14,11 ±0,57	13,56 ±0,6	14,11 ±0,75	10,74
<i>T. harzianum rifai</i> Б/л 20	6	6	6	6	18,22 ±0,62	6	18,22 ±0,55	15,67 ±0,57	6	15,00 ±0,69	13,89 ±0,44	12,89 ±0,44	10,82
амфотерицин В	6	6	22,67 ±0,86	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7,39
ципрофлоксацин	6	23,00 ±0,57	6	6	26,67 ±0,65	16,33 ±0,86	25,33 ±0,86	27,00 ±0,98	6	23,33 ±0,86	22,67 ±0,86	20,33 ±0,86	17,39
хлоргексидин	11,00 ±0,57	23,00 ±1,13	6	9,67 ±0,33	27,33 ±0,86	6	25,33 ±0,33	23,67 ±0,33	8,33 ±1,42	6	22,67 ±0,33	26,00 ±2,06	16,25
K <sub>S</sub>	6,56	9,78	7,85	6,41	19,06	7,15	18,04	16,31	6,26	13,81	14,8	15,12	

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

С максимальным значением коэффициента антибиотической активности 10,91 наиболее активный в отношении Грам- бактерий *T. harzianum* Rifai Б/л 14.

Наибольшая чувствительность определяется у *E. coli* ATCC 25922 – с коэффициентом чувствительности 19,06 и максимальной зоной угнетения роста - Ø 18,89 ±0,53 мм, установленной в эксперименте с *T. harzianum* Rifai Б/л 14, что подтверждено наименьшим показателем отношения  $K_A$  к  $K_S$  равное 0,57, в связи с чем, эти объекты были выбраны для дальнейшего исследования.

## 3.2 Биологические свойства перспективного штамма-продуцента

### 3.2.1 Молекулярно-генетическая идентификация

Секвенирование штамма проводилось в Венском технологическом университете (Австрия). Анализ продуктов полимеразной цепной реакции производили на автоматизированном капиллярном секвенатор «ABI PRISM» (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидной последовательности основано на методе Сэнджера. Для идентификации использовали филогенетический маркер *Tef1\_int4* (большой), модифицированный из Дружинина, И. и Кубичек (2005). Протокол исследования представлен в приложении 1. Идентификация штамма была подтверждена информацией из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/641482460?report=genbank&log\\$=nucltop&last\\_rank=1&RID=SSS4DKP3015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/641482460?report=genbank&log$=nucltop&last_rank=1&RID=SSS4DKP3015)):

LOCUS KJ665383 1253 bp DNA linear PLN 29-OCT-2015  
DEFINITION *Trichoderma atrobrunneum* strain S343 translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) gene, partial cds.  
ACCESSION KJ665383  
VERSION KJ665383.1  
KEYWORDS .  
SOURCE *Trichoderma atrobrunneum*  
ORGANISM *Trichoderma atrobrunneum*  
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;  
Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae;  
*Trichoderma*.



REFERENCE 1 (bases 1 to 1253)

AUTHORS Jaklitsch,W.M. and Voglmayr,H.

TITLE Biodiversity of Trichoderma (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia

JOURNAL Stud. Mycol. 80, 1-87 (2015)

PUBMED 26955191

REFERENCE 2 (bases 1 to 1253)

AUTHORS Jaklitsch,W.M. and Voglmayr,H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (04-APR-2014) Dept. Botany and Biodiversity Research, University of Vienna, Rennweg 14, Wien A-1030, Austria

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method :: SeqMan v. 7

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1253

/organism="Trichoderma atrobrunneum"

/mol\_type="genomic DNA"

/strain="S343"

/db\_xref="taxon:1491457"

/country="Spain"

gene <1..>1253

/gene="tef1"

mRNA join(<267..405,465..>1253)

/gene="tef1"

/product="translation elongation factor 1-alpha"

CDS join(<267..405,465..>1253)

/gene="tef1"

/codon\_start=1

/product="translation elongation factor 1-alpha"

/protein\_id="AIA65728.1"

/translation="EAAELGKGSFKYAWVLDKKAERERGITIDIALWKFETPKYYVT

VIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAILIIAAGTGEFEAGISKDGTREHALLAYTL  
GVK

QLIVAINKMDTANWAEARYQEIIKETSNFIIKKVGFNPKAVAFVPISGFNGDNML  
QAST

NCPWYKGWEKETKAGKFTGKTLLEAIDSIEPPKRPTDKPLRLPLQDVYKIGGIG  
TVPV

GRIETGILKPGMVVTFAPSNVTTEVKSVEMHHEQLVEGVPGDNVGFNVKNVSV  
KEIRR

GNVAGDSKNDPPMGAASFTAQVIVMNHPGQVGA" ORIGIN

1 ctcgattett cctccttcaac attcaattgt gcccgacaat tctgcagaga atttctgtgt  
61 cgacaatttt tcatcacccc gtttccatt acccctcctt tgcagcgacg caaaattttt  
121 ttctgtcgtt tggtttttag tgggggtctc tgtgcaacc cactagctca ctgcttttc  
181 ctgcttcaact ctcacttct ctgcatcatt caacacgctc tgtgtctttg gtcattcage  
241 gatgtaacc acttttccat caataggaag cgcggaact cggcaagggt tccttcaagt  
301 acgcttgggt tcttgacaag ctcaaggccg agcgtgagcg tggatcacc atcgacattg  
361 ctctgtgga gttcgagact cccaagtact atgtcacctg cattggtagt tcttcatca  
421 tctcatgggt caactgcgag ctagtgctaa catgcaattc acagacgctc cggccaccg  
481 tgatttcate aagaacatga tcaactgttac tcccaggcc gattgcgcta tctcatcat  
541 tgccgccggt actggtgagt tgcaggctgg tatctccaag gatggccaga cccgtgagca  
601 cgctctgctc gcctacacc tgggtgctaa gcagctcacc gttgcatca acaagatgga  
661 cactgccaac tgggcccagg ctctgtacca ggaatcacc aaggagacct ccaacttcat  
721 caagaaggtc ggcttcaacc ccaaggctgt tcttctgctc cccatctccg gtttcaacgg  
781 tgacaacatg ctccaggcct ccaccaactg cccctggtac aagggtggg agaaggagac  
841 caaggctggc aagttcaccg gcaagacct ccttggaggct atcgactcca tcgagcccc  
901 caagcgtccc acggacaagc cctcctgctt tcccctccag gatgtctaca agatcgggtg  
961 tctcggaaca gttcccgtc gccgtatcga gactggtatc ctcaagcccg gtatggctgt  
1021 caccttctgct cctccaacg tcactactga agtcaagtcc gtcgagatgc accacgagca  
1081 gctcgtcag ggtgttccc gtagacaact tggtttcaac gtcaagaacg tttccgtaa  
1141 ggaaattcgc cgtggtaac ttgccggtga ctccaagaac gacccccca tgggtgccgc  
1201 ttcttcacc gctcaggtea tctcatgaa ccacctggc caggctgggtg ccg

В 2018 году штамм *Trichoderma atrobrunneum* был депонирован в Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт - ГосНИИгенетика», регистрационный номер F-1434 (приложение 2).

### 3.2.2 Культуральные и морфологические свойства

Для изучения культуральных свойств *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 микромицет выращивали на универсальных питательных средах для культивирования грибов: «Чапек» – CZA, «обедненный синтетический агар» – NSA, «картофельно-декстрозный агар» – PDA, «сусло агар» – WA, «Сабуро» – SDA. Среда готовили в соответствии общепринятым рецептурам (рисунок 3).

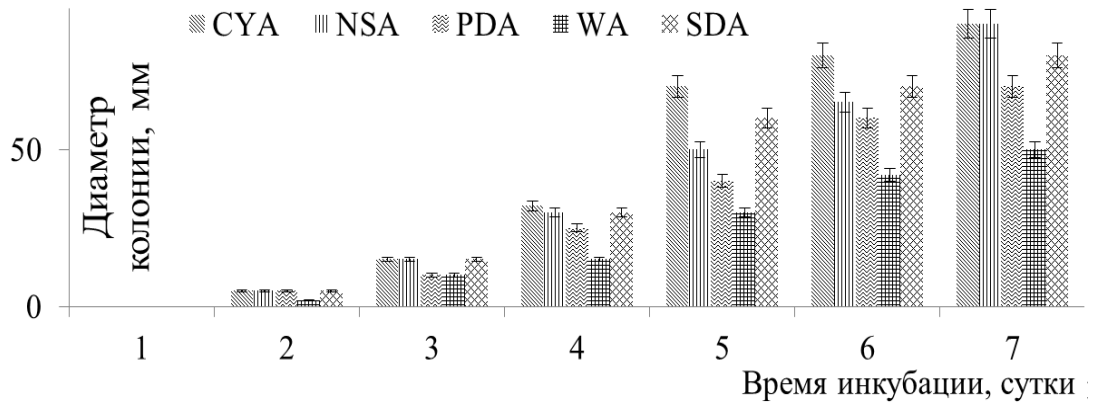


Рисунок 3. Рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на плотных средах

На среде CZA гриб растет очень быстро –  $14,0 \pm 5$  мм за сутки инкубирования, краев чашки Петри (90 мм) достигает на 7 сутки. Мицелий белого цвета до 2 мм в высоту, образование конидий обильное, концентрическими зонами.

На среде NSA микромицет вырастает до 90,0 мм за 7 суток. Воздушный мицелий практически отсутствует, образование конидий среднее.

На среде WA рост до  $50,0 \pm 5$  мм на 7 сутки культивирования. К 10 суткам зарастает вся чашка Петри. Мицелий средний, спороношение среднее.

На среде PDA микроорганизм вырастает до 60,0 мм за 7 суток. Мицелий до 1 мм в высоту, спороношение обильное.

На среде Сабуро рост быстрый, обильный – 80,0 мм на 7 сутки, мицелий до 2 мм в высоту, спороношение среднее.

В ходе постановки эксперимента определили физиологическую зависимость диаметра колонии гриба от величины  $pH$  питательной среды. Наиболее обильный, и быстрый рост микромицета соответствует максимальному из имеющихся значению  $pH$ , изменение этих показателей имеет прямую зависимость,  $r=0,889$ .

Таким образом, исходя из полученных данных, оптимальным  $pH$  для культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 является 7,3, оптимальная питательная среда для накопления биомассы – CZA, г/л: Сахароза – 30;  $Na_2NO_3$  – 2,0;  $K_2HPO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5, KCL – 0,5;  $FeSO_4$  – 0,01. Рост культуры представлен на рисунке 4.

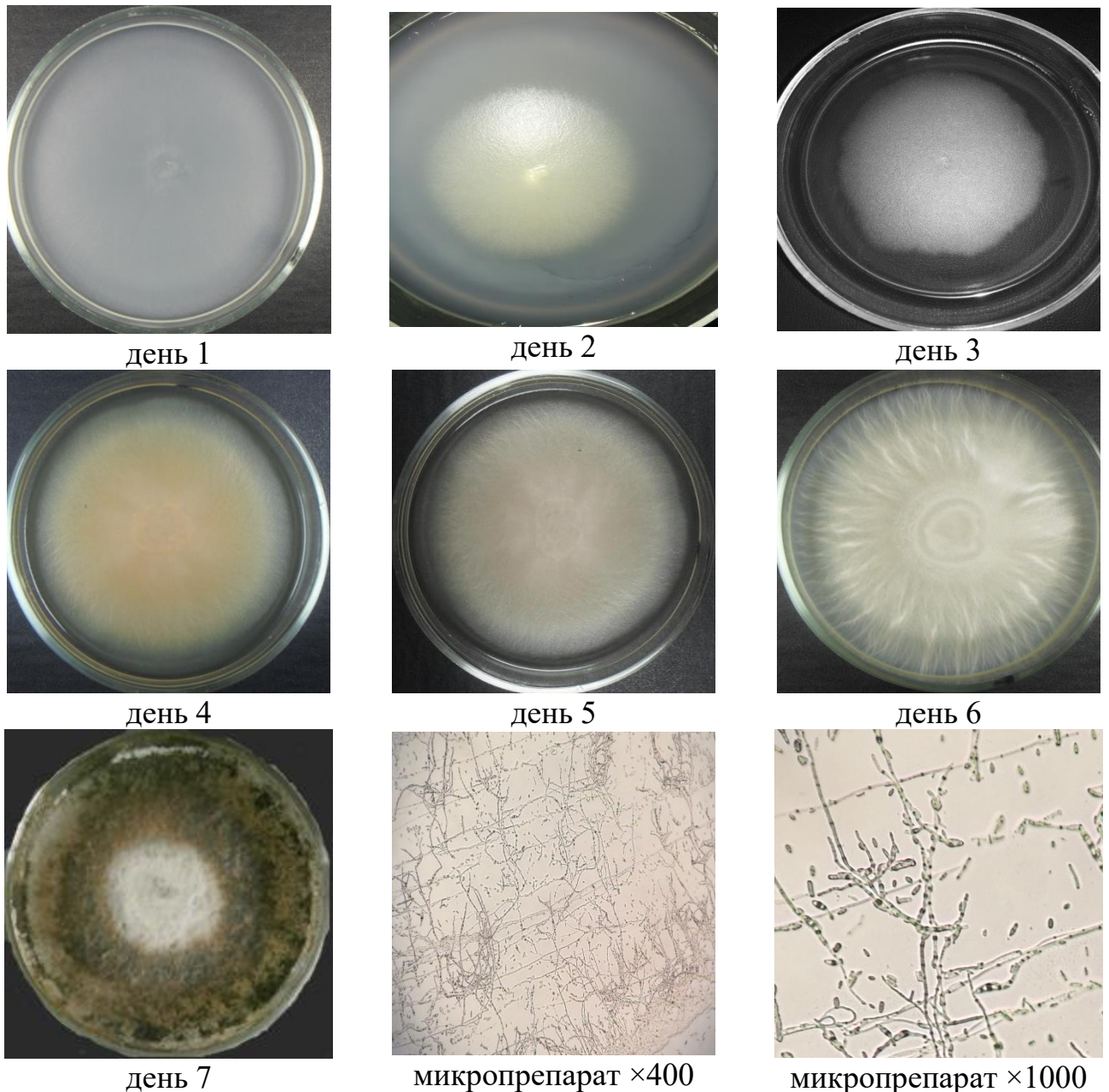


Рисунок 4. Рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на оригинальной питательной среде

Край колонии неровный, воздушный мицелий скудный, паутинистый, до 2 мм в высоту, рыхлый, белого цвета. Спороношение на 7-10 сутки зеленое обильное, формирующееся концентрическими зонами на воздушном мицелии и в плотных подушечках; пигмент и экссудат отсутствуют; по мере старения гриб обильно споронсит.

На микропрепарате мицелий септированный, тонкий, неокрашенный; конидиеносцы древовидно разветвленные, формируются в плотных группах и на воздушном мицелии. Фиалиды собраны в группы по 2-5, с расширенной

базальной частью и короткой узкой шейкой 5-6×3-5 мкм, терминальные фиалиды более вытянутые ( $\leq 10-12$  мкм в длину); конидии формируются в слизистых головках, почти шаровидные, яйцевидные 2,5-3,5×2,5-3,0 мкм, гладкие, зеленые.

### 3.2.3 Биохимические свойства

Биохимические свойства продуцента характеризовали по способности синтезировать специфичные вещества и ассимилировать различные классы органических соединений. Результаты культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на мультисубстратной тест-системе представлены в таблице 12.

Согласно представленным данным, *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 синтезирует ферменты лейцинариламидазу,  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазу,  $\gamma$ -глутамилтрансферазу, PNP-N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминидазу. Способность штамма синтезировать ферменты легло в основу его использования в составе биологических средств защиты сельскохозяйственных растений, в том числе овощных культур [12, 41], Патенты РФ № 2626174, №2785674 (приложение 11, 12). *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 ассимилирует субстраты, представленные в таблице 13.

Таблица 13. Субстраты, ассимилируемые *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

спирты		дисахариды				моносахариды			кислоты					
									амино		поликарбоновые		уроновые	
Глицерин	Ксилит	D-мальтоза	D-мелибиоза	D-трегалоза	Сахароза	D-галактоза	D-глюкоза	L-арабиноза	L-аргинин	L-глутамат	L-малат	Na-цитрат	D-галактуронат	D-глюкуронат

Полученный биохимический профиль *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 представляется впервые, является уникальным для культуры и может служить ее идентификатором. Так же он отражает спектр субстратов и позволяет определить наиболее предпочтительный для культивирования гриба, что будет применено в исключительном эксперименте в дальнейшей работе.

Таблица 12. Биохимические свойства *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

№		Наименование теста		Результат
POS	LOT	Код	Расшифровка	
1	3	LysA	L-лизинариламидаза	neg
2	4	IMLTa	L-МАЛАТ, ассимиляция	pos
3	5	LeuA	Лейцинариламидаза	pos
4	7	ARG	АРГИНИН	pos
5	10	ERYa	Ассимиляция ЭРИТРИТОЛ	neg
6	12	GLYLa	Ассимиляция ГЛИЦЕРИН	pos
7	13	TyrA	Тирозинариламидаза	neg
8	14	BNAG	$\beta$ -N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИДАЗА	pos
9	15	ARBa	Ассимиляция АРБУТИНА	neg
10	18	AMYa	Ассимиляция АМИГДАЛИНА	neg
11	19	dGALa	Ассимиляция D-ГАЛАКТОЗЫ	pos
12	20	GENa	Ассимиляция ГЕНЦИБИОЗЫ	neg
13	21	dGLUa	Ассимиляция D-ГЛЮКОЗЫ	pos
14	23	LACa	Ассимиляция ЛАКТОЗЫ	neg
15	24	MAAdGA	Ассимиляция МЕТИЛ- $\alpha$ -D ГЛЮКОПИРАНОЗИДА	neg
16	26	dCELa	Ассимиляция D-ЦЕЛЛОБИОЗЫ	neg
17	27	GGT	ГАММА-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗА	pos
18	28	dMALa	Ассимиляция D-МАЛЬТОЗЫ	pos
19	29	dRAFa	Ассимиляция D-РАФИНОЗЫ	neg
20	30	NAGA1	PNP-N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминидаза	pos
21	32	dMNEa	Ассимиляция D-МАННОЗЫ	neg
22	33	dMELa	Ассимиляция D-МЕЛИБИОЗЫ	pos
23	34	dMLZa	Ассимиляция D-МЕЛЕЦИТОЗЫ	neg
24	38	ISBEa	Ассимиляция L-СОРБОЗЫ	neg
25	39	IRHAa	Ассимиляция L-РАМНОЗЫ	neg
26	40	XLTa	Ассимиляция КСИЛИТА	pos
27	42	dSORa	Ассимиляция D-СОРБИТА	neg
28	44	SACa	Ассимиляция САХАРОЗЫ	pos
29	45	URE	УРЕАЗА	neg
30	46	AGLU	АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА	neg
31	47	dTURa	Ассимиляция D-ТУРАНОЗЫ	neg
32	48	dTREa	Ассимиляция D-ТРЕГАЛОЗЫ	pos
33	49	NO <sub>3</sub> a	Ассимиляция НИТРАТА	neg
34	51	IARAa	Ассимиляция L-АРАБИНОЗЫ	pos
35	52	dGATa	Ассимиляция D-ГАЛАКТУРОНАТА	pos
36	53	ESC	Гидролиз ЭСКУЛИНА	neg
37	54	IGLTa	Ассимиляция L-ГЛУТАМАТА	pos
38	55	dXYLa	Ассимиляция D-КСИЛОЗЫ	neg
39	56	LATa	Ассимиляция DL-ЛАКТАТА	neg
40	58	ACEa	Ассимиляция АЦЕТАТА	neg
41	59	CITa	Ассимиляция ЦИТРАТА (НАТРИЯ)	pos
42	60	GRTas	Ассимиляция D-ГЛЮКУРОНАТА	pos
43	61	IPROa	Ассимиляция L-ПРОЛИНА	neg
44	62	2KGa	Ассимиляция 2-КЕТО-D-ГЛЮКОНАТА	neg
45	63	NAGa	Ассимиляция N-АЦЕТИЛ-ГЛЮКОЗАМИНА	neg
46	64	dGNTa	Ассимиляция D-ГЛЮКОНАТА	neg

### 3.3 Подбор условий культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Определение оптимального субстрата для культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 предусматривало реализацию трех этапов: 1 – понижение размерности выборки за счет исключаящего эксперимента; 2 – выбор субстрата; 3 – определение кинетики ассимиляции субстрата.

В эксперименте использовали солевую основу среды CZA («Чапек»), г/л:  $\text{Na}_2\text{NO}_3$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5, KCL – 0,5;  $\text{FeSO}_4$  – 0,01.

#### 3.3.1 Исключающий эксперимент

Исключающий эксперимент проводили на основании матрицы (см. таблица 1), где факторами являются ранее установленные субстраты, ассимилируемые *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Стремясь к снижению трудоемкости эксперимента и стараясь избежать возможной маскировки одного компонента питательной среды другим, нижний уровень принимали за ноль, верхние уровни соответствовали навеске субстрата в стандартной рецептуре среды Чапек.

На первом этапе исследования согласно матрице планирования были сформированы 16 рецептов питательных сред, на которых определяли диаметры колоний *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (таблица 14).

Таблица 14. Диаметр колонии *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на рандомизированных питательных средах

№	$\bar{y}_i$	$\sigma$	$S^2_{\bar{y}_i}$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$
1	29,57	1,01	1,01	0,20	0,26
2	36,43	1,06	1,12		
3	30,00	2,40	5,77		
4	37,14	0,45	0,20		
5	21,29	2,52	6,37		
6	36,12	0,95	0,90		
7	41,71	0,46	0,21		
8	35,96	0,21	0,04		
9	34,82	0,95	0,90		
10	31,05	1,07	1,14		
11	26,99	1,27	1,62		
12	28,37	1,69	2,84		
13	35,59	1,14	1,29		
14	36,10	1,65	2,73		
15	34,60	1,57	2,47		
16	35,80	1,74	3,02		

На основании первичных результатов, для каждого опыта рассчитывали дисперсию и определяли значение критерия Кохрена. Экспериментальное значение критерия Кохрена не превышает табличного значения, что и подтверждает гипотезу об однородности дисперсий, следовательно, опыты считаются воспроизводимыми, а первичные результаты статистически значимыми. Параллельно была реализована постановка контрольной серии опытов на среднем уровне концентрации компонентов,  $x^0_j$ , для которой дисперсия  $S^2_{\bar{y}_0} = 9,69$ .

Воздействие каждого компонента на диаметр колонии определяли по величине соответствующего коэффициента, наиболее влияющие факторы исключали из эксперимента. За один раунд эксперимента выводили по два компонента. Для компенсации исключения влияющих компонентов производили корректировку значений диаметра колонии в соответствующих опытах. Исключение компонентов и корректировку результатов останавливали при достижении значения дисперсии воспроизводимости, соразмерного значению дисперсии контрольной серии (таблица 15).

Таблица 15. Корректировка значений диаметра колонии по коэффициентам влияющих факторов

№	$\bar{y}_i$	Корректировка $\bar{y}_i$		
		1 раунд	2 раунд	3 раунд
1	29,57	16,84	16,84	22,30
2	36,43	23,70	23,70	29,16
3	30,00	17,27	24,91	28,40
4	37,14	24,41	27,56	29,53
5	21,29	27,21	27,21	27,21
6	36,12	23,39	26,54	32,00
7	41,71	28,98	28,98	34,44
8	35,96	23,23	30,87	30,87
9	34,82	22,09	26,58	26,58
10	31,05	24,24	24,24	29,70
11	26,99	20,18	27,82	27,82
12	28,37	15,64	23,28	23,23
13	35,59	22,86	26,01	27,98
14	36,10	23,37	23,37	28,83
15	34,60	21,87	21,81	27,27
16	35,80	28,99	28,99	30,96
$S^2_y$	24,78	15,19	11,43	9,07



В 3 раунде получили дисперсию воспроизводимости 9,07, что составило 94% дисперсии контрольной серии и возможно признать соизмеримой величиной, остановить исключаящий эксперимент и рассчитать значение критерия Фишера:

$$F_{\text{расч}} = \frac{9,07}{9,69} = 0,94; F_{\text{табл}}(0,95; 3; 16) = 3,24; F_{\text{расч}} \leq F_{\text{табл}}.$$

Так как экспериментальное значение критерия Фишера меньше табличного подтверждается статистическая значимость полученных результатов. Для исключения парного взаимодействия влияющих факторов строили диаграммы рассеивания (рисунок 5).

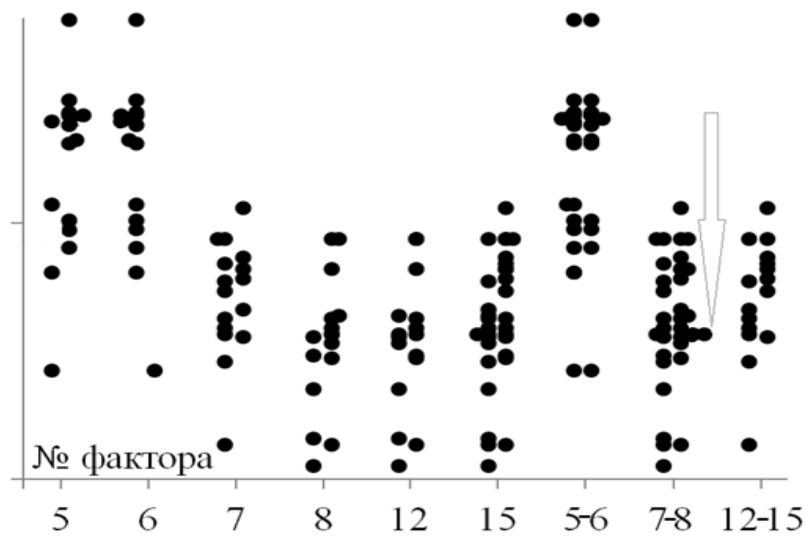


Рисунок 5. Диаграммы рассеивания факторов

На рисунке 5 в диаграмме взаимодействия факторов №7 и №8 зафиксировано появление точки нового уровня, что свидетельствует о наличие парного взаимодействия факторов. При выборе между галактозой и глюкозой следует произвести дифференциальный анализ субстратов в тест-системе: как участвующих, так и не вошедших в исключаящий эксперимент (рисунок 6).

В тест-системе присутствовала реакция на ассимиляцию трисахарида раффинозы ( $\alpha$ -D-Галактопиранозил-(1-6)- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1-2)- $\beta$ -D-фруктофуранозид), которая не принимала участие в эксперименте, т.к. ранее была признана неассимилируемой. Однако, при рассмотрении ее структурных компонентов: галактоза, глюкоза, фруктоза, а также их комбинаций: мелибиоза, сахароза; получили следующие результаты:

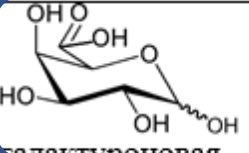
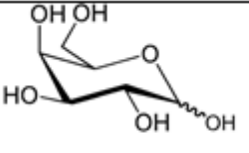
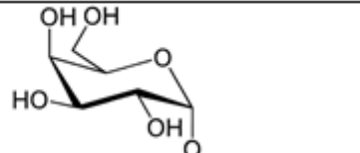
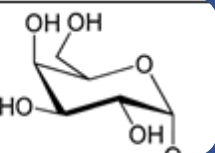
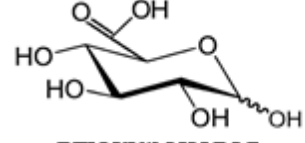
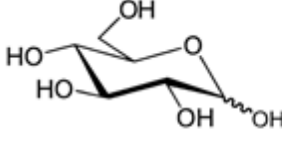
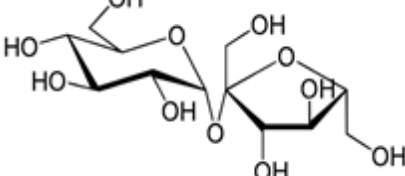
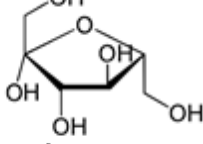
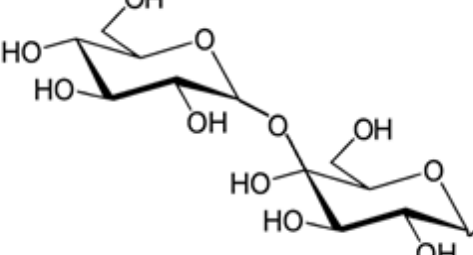
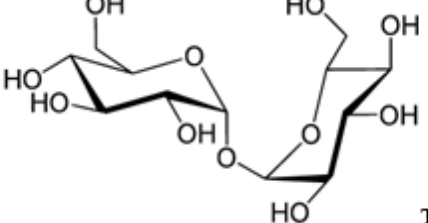
 <p>галактуроновая кислота</p>	 <p>галактоза</p>	 <p>мелибиоза</p>	 <p>рафиноза</p>
 <p>глюкуроновая кислота</p>	 <p>глюкоза</p>	 <p>сахароза</p>	
		 <p>фруктоза</p>	
		 <p>мальтоза</p>	
		 <p>трегалоза</p>	

Рисунок 6. Структурные формулы субстратов

- дисахарид мелибиоза – был выведен из эксперимента как не влияющий фактор. Известно, что мелибиоза гидролизуется с разрывом  $\alpha$ -1,6 связи и образованием эквимольных концентраций галактозы и глюкозы;

- дисахарид сахароза – был принят как влияющий фактор. Известно, что сахароза гидролизуется с разрывом  $\alpha$ -1,2 связи и образованием эквимольных концентраций глюкозы и фруктозы.

Дисахарид мальтозы был выведен из эксперимента как не влияющий фактор. Известно, что мальтоза гидролизуется с разрывом  $\alpha$ -1,6 связи и образованием двух молекул глюкозы. Дисахарид трегалозы был принят как влияющий фактор. Известно, что трегалоза гидролизуется с разрывом  $\alpha$ -1,1 связи и образованием двух молекул глюкозы. Галактуроновая и глюкуроновая кислоты были выведены из эксперимента как не влияющие факторы. На совокупности вышеизложенного, можно сделать заключение, что производные галактозы не участвуют или выводятся из исключаящего эксперимента, как не влияющие факторы.

Таким образом, в эксперименте оставили глюкозу, т.к. она, и ее производные очевидно предпочтительнее для *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и выражено влияют на рост культуры.

В итоге получили 5 влияющих факторов, коэффициенты которых признаны значимыми, так как подтверждается гипотеза об их отличии от нуля: модуль расчетного значения каждого коэффициента больше произведения дисперсии коэффициентов и критерия Стьюдента (таблица 16).

Таблица 16. Значимые коэффициенты и влияющие факторы

Коэффициент	$b_5$	$b_6$	$b_8$	$b_{10}$	$b_{13}$
	-5,92	12,73	-4,49	-3,15	-3,49
Фактор	$X_5$	$X_6$	$X_8$	$X_{10}$	$X_{13}$
	D-трегалоза	сахароза	D-глюкоза	L-аргинин	Na-цитрат

Установленные компоненты, обеспечивают наибольший прирост биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Стоит заметить, что L-аргинин является одной из двух условно заменимых аминокислот, а Na-цитрат, точнее его ионизированная форма, аналогично лимонной кислоте, участвует в цикле трикарбоновых кислот

общего пути катаболизма. Следовательно, два крайних компонента, имея свою важную роль в биохимических процессах, принимаются как факторы роста.

Таким образом, в дальнейшем исследовании в качестве субстратов принимаются D-трегалоза, сахароза, D-глюкоза.

### 3.3.2 Выбор субстрата

С целью установления оптимального для *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 субстрата оценивали влияние трегалозы, сахарозы и глюкозы на параметры роста культуры в условиях гетерофазного глубинного периодического культивирования. В эксперименте использовали солевую основу среды CZA, с добавлением факторов роста L-аргинина, Na-цитрата в количестве 1 г/л и сахаров в их рецептурной навеске [84]. Зависимость роста культуры от субстратов представлена на рисунке 7.

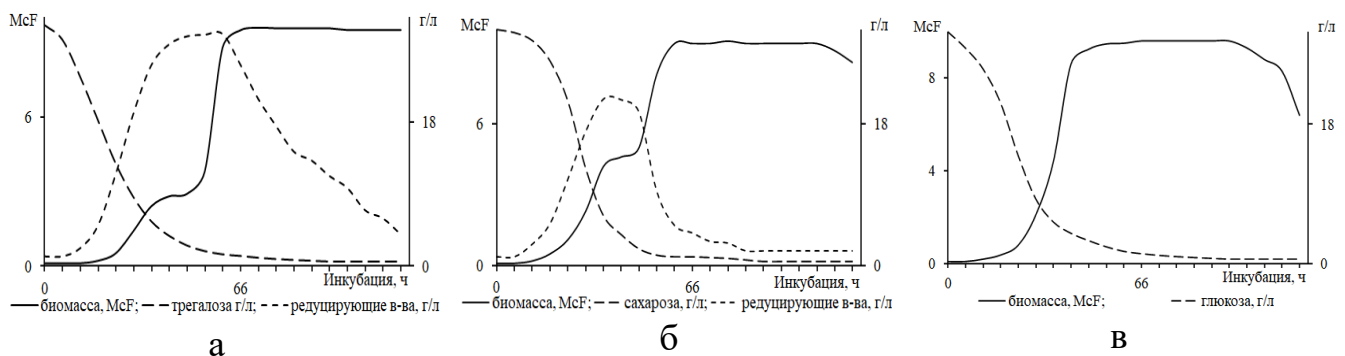


Рисунок 7. Влияние субстрата на рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434:  
а – трегалоза; б – сахароза; в – глюкоза.

На графике приращения биомассы это сопровождается двухфазным ростом *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 – явление диауксии. Подобное явление встречается при культивировании микроорганизма в среде с содержанием двух источников углерода. Очевидно, это может быть связано проявлением катаболитной репрессии, вызванной высвобождением глюкозы при гидролизе как трегалозы, так и сахарозы. Согласно графику приращения биомассы, выход на вторую экспоненциальную фазу приходится на максимум содержания редуцирующих веществ, в то же время концентрация исходных субстратов – трегалозы и сахарозы стремится к минимуму. Это говорит о том, что первый прирост

осуществлялся за счет дисахаридов, а второй – за счет моносахарида – глюкозы. Для штамма *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 данное явление описывается впервые.

Критерием выбора субстрата использовали метаболический коэффициент ( $q$ ) – он характеризует количественную потребность в субстрате каждой единицы микроорганизма, что позволяет рассчитать посевную дозу продуцента под навеску субстрата. Для расчета метаболического коэффициента определяли субстратную константу ( $K_S$ ) и максимальную удельную скорость роста ( $\mu_m$ ).

Эти параметры обусловлены уникальными физиолого-биохимическими особенностями штамма, условиями культивирования, природой утилизируемого субстрата и его концентрацией в среде. Для расчета  $K_S$ ,  $\mu_m$ , ставили серию опытов с варьированием концентрации сахарозы от 3 до 30 с шагом в 3 г/л;  $T=30^\circ\text{C}$ . По величине прироста биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 за единицу времени определяли удельную скорость роста при каждой концентрации (формула 8):

$$\mu_0 = \frac{\ln \frac{X_0}{X}}{t} \quad (8).$$

Получали зависимость удельной скорости роста от концентрации сахарозы, в линейный вид которую преобразовывали методом Лайнуивера-Берка (формула 9):

$$\frac{1}{\mu_0} = b \times \frac{1}{S_0} + a \quad (9),$$

в которой определяли угловой коэффициент –  $b$  и свободный член –  $a$ .

Значение  $\mu_{max}$  определяли свободному члену (формула 10):

$$\mu_{max} = \frac{1}{a} \quad (10).$$

Значение  $K_S$  численно равно определяется по угловому коэффициенту и максимальной удельной скорости (формула 11):

$$K_S = b \times \mu_{max} \quad (11).$$

Получив значения констант роста, рассчитывали удельную скорость роста по формуле Моно (формула 12):

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{S}{K_S + S} \quad (12),$$

и рассчитывали значение метаболического коэффициента (формула 13):

$$q = \mu / \frac{dS}{dt} \quad (13)$$

Результаты исследований представлены в таблице 17.

Таблица 17. Константы роста *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Константы	субстраты		
	трегалоза	сахароза	глюкоза
$K_S$ , г/л	47,62	85,08	34,78
$\mu_{\max}$ ( $\times 10^{-2}$ ), ч <sup>-1</sup>	6,65	9,17	5,93
$\mu$ ( $\times 10^{-2}$ ), ч <sup>-1</sup>	2,57	2,39	2,75
$q$ ( $\times 10^{-3}$ ), г/ч $\times$ л $\times$ КОЕ	29	59	19

Наибольшая величина метаболического коэффициента установлена в опыте с сахарозой и составила 0,059 г/КОЕ $\times$ ч $\times$ л.

Таким образом, был определен субстрат для культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, г/л: сахароза 30,0.

### 3.3.3 Определение кинетики ассимиляции субстрата.

Константу скорости ассимиляции субстрата рассчитывали на основании графика зависимости концентрации сахарозы от времени реакции [78]. Концентрацию сахарозы измеряли через каждые 10 минут, инкубировали на термостатируемом шейкере при температуре +20°C (рисунок 8).

Известно, что гидролиз сахарозы имеет первый порядок реакции, следовательно, уравнение скорости реакции получает вид (формула 14):

$$v = k_I(S_0 - S) = dS/dt \quad (14).$$

Проинтегрировав, получали (формула 15):

$$\ln S_0 = \ln(S_0 - S) + k_I t \quad (15),$$

откуда получали формулу для расчета константы скорости (формула 16):

$$k_1 = \ln \frac{S_0}{S_0 - S} \times \frac{1}{t} = 2,07 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1} \quad (16).$$

Оптимальную температуру для ассимиляции сахарозы определяли в опыте при варьировании значением показателя в пределах от 18-43°C, с шагом 5 градусов. Выявлен оптимальный температурный интервал 23-33°C, за рамками

которого ассимиляция сахарозы сокращается на 9,75-98,66%. Для каждого значения температуры рассчитывали константу скорости, получали экспоненциальную зависимость между данными параметрами (рисунок 9).

Полученная зависимость описывается уравнением Аррениуса (формула 17):

$$k = A \times e^{-E_a/RT} \quad (17),$$

которое показывает влияние энергии активации на константу скорости реакции.

Для решения уравнения необходимо определить значение предэкспоненциального множителя, которое определяли преобразованием графика в линейную функцию. Из формулы 10, проинтегрировав, получали линейную функцию,  $R^2 > 0,9$  (формула 18):

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (18),$$

в которой  $\ln A$  является свободным членом и его значение вычисляется по экспериментальным данным. В итоге, значение предэкспоненциального множителя  $A = e^{-20,7} = 9,97 \times 10^{-10} \text{ с}^{-1}$ . Из равенства (18) находили энергию активации (формула 19):

$$E_a = RT \times \ln \frac{k}{A} \quad (19).$$

Так, изменение температуры пропорционально изменяет значение константы скорости и обратно пропорционально значение энергии активации (рисунок 10).

При сопоставлении графиков линейных зависимостей константы скорости и энергии активации по шкале температуры определили пересечение в точке со значением температуры  $31^\circ\text{C}$  ( $k^{31} = 5,12 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ ;  $E_a^{31} = 44,85 \text{ кДж/моль}$ ), которую приняли за оптимум.

В дальнейшем определяли зависимость скорости ассимиляции сахарозы ее от концентрации. Для чего ставили серию опытов с варьированием в реакционной смеси от 0,05 до 0,275 моль/л сахарозы, с шагом в 0,025;  $T=31^\circ\text{C}$  и определяли ее количество, ассимилированное за единицу времени (рисунок 11).

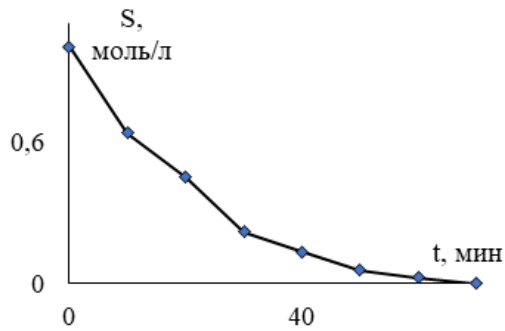


Рисунок 8. График зависимости концентрации сахарозы от продолжительности реакции

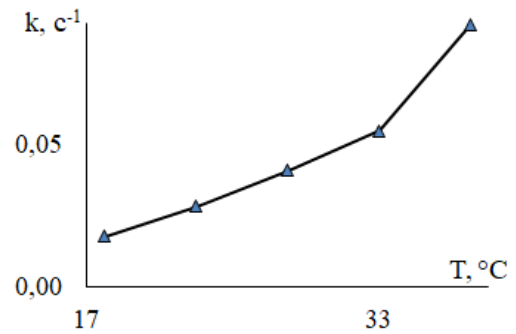


Рисунок 9. График зависимости константы скорости от температуры реакции

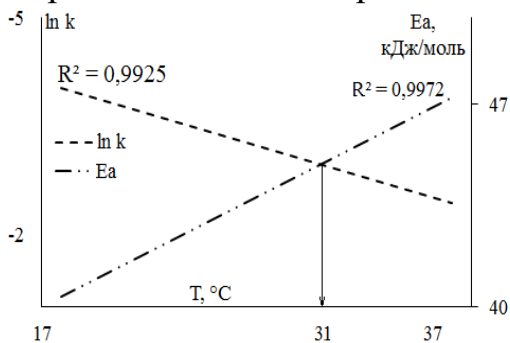


Рисунок 10. График зависимости константы скорости и энергии активации от температуры

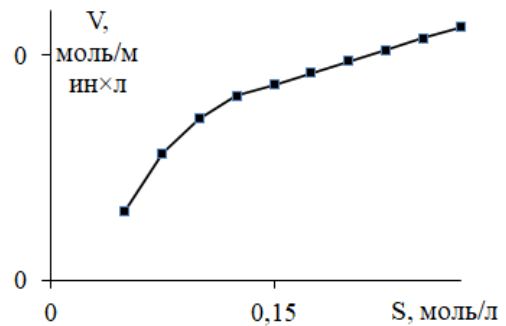


Рисунок 11. График зависимости скорости ассимиляции сахарозы от ее концентрации

Согласно рисунку, была установлена насыщающая концентрация сахарозы  $S=0,25$  моль/л, при которой график зависимости скорости ассимиляции сахарозы её от концентрации переходит в прямую линию, параллельную оси OX, что говорит о достижении максимальной скорости  $V_m$ .

Числовое выражение максимальной скорости определяли преобразованием графика в линейную функцию  $y = b \times x + a$  методом Лайнуивера-Берка,  $R^2 > 0,9$  (формула 20):

$$\frac{1}{V} = b \times \frac{1}{S} + a \quad (20),$$

для чего рассчитывали угловой коэффициент –  $b$  и свободный член –  $a$ .

Максимальная скорость равна значению точки пересечения графика с осью OY, т.е. выражается как обратное значение свободного члена, следовательно,  $V_m = 1/a = 3,44 \times 10^{-3}$  моль/мин×л. Используя массу 1 моль сахарозы  $M_r = 342,3$  г/моль, перевели размерность в удобный формат:  $3,44 \times 10^{-3} \times 342,3 \times 60 = 70,58$  г/ч×л.



Таким образом, максимальная скорость ассимиляции сахарозы при оптимальной температуре 31°C составляет  $V_m$  70,58 г/ч×л. Для накопления биомассы продуцента среду CZA («Чапек») модифицировали, получив состав, г/л: Сахароза – 30;  $Na_2NO_3$  – 2,0;  $K_2HPO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5, KCL – 0.5;  $FeSO_4$  – 0,01; L-аргинин – 1,0; Na-цитрат – 1,0.

### 3.4 Подбор условий экстракции БАВ *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

#### 3.4.1 Выбор источника БАВ

Для определения источника биологически активных соединений, продуцент культивировали в среде, состав которой был разработан согласно его индивидуальным потребностям, при варьировании режимами: твердофазное культивирование, гетерофазное поверхностное и глубинное культивирование. Оценку продуктивности БАВ проводили по чувствительности тест-культур при совместной инкубации с продуктами культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (рисунок 12).

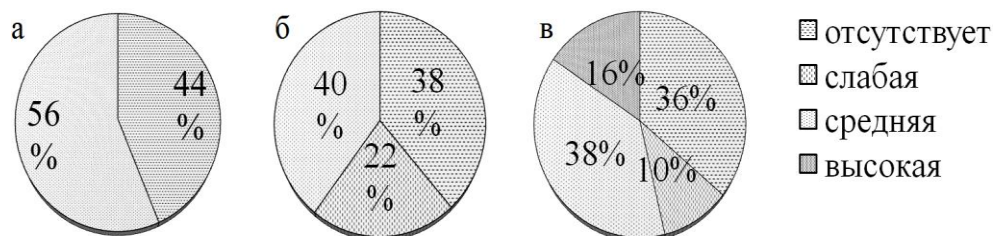


Рисунок 12. Чувствительность тест-культур при совместной инкубации с продуктами культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434: а – твердофазное культивирование; б – гетерофазное поверхностное; в – гетерофазное глубинное

Твердофазное культивирование – самый распространенный способ выращивания микроорганизмов, простейшим вариантом которого является чашечный метод на плотной питательной среде. В случае настоящего эксперимента среду нагружали всеми необходимыми питательными веществами и доводили агаром до плотности, необходимой для получения стабильных блоков. Питательные вещества поступают за счет диффузии из участка среды, локализованного под биомассой микромицета, из-за чего культура растет

радиально по поверхности, образуя газон, который использовали для выделения блока. Метод блоков обеспечивает непосредственный контакт живых тест-культур на площади их соприкосновения. Живые культуры, реагируя друг на друга, выделяют метаболиты, которые диффундируют в питательную среду и на всей площади их распространения преобладает рост доминирующего микроорганизма.

При гетерофазном культивировании питательные вещества поступают к потребителю за счет диффузии из жидкой фазы. Принципиальная разница между поверхностным – стационарным и глубинным культивированием состоит в перемешивании среды с момента инокуляции.

Гетерофазное поверхностное культивирование характерно образованием плавучего «конгломерата» из переплетенного мицелия. Гетерофазное глубинное культивирование предполагает постоянное перемешивание питательной среды (погружными мешалками или орбитальным перемешиванием на «качалках»), за счет чего происходит равномерное смешивание питательных веществ и биомассы потребителя, обеспечивая их наилучшее взаимодействие.

При раздельном исследовании биомассы и культуральной жидкости продуцента, полученных в экспериментах гетерофазного культивирования, на рисунке 13 представлены результаты, говорящие о диаметрально направленных эффектах БАВ биомассы продуцента и культуральной жидкости.

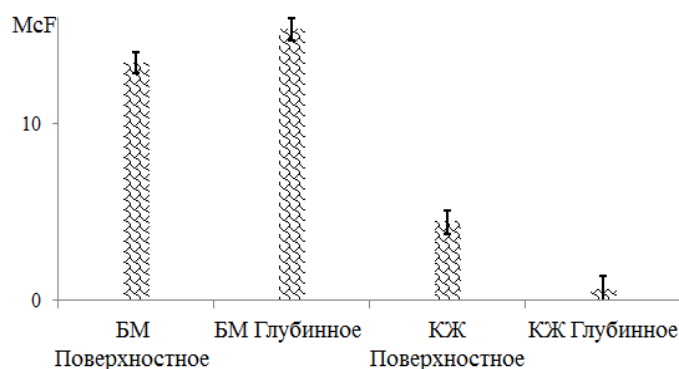


Рисунок 13. Эффекты БАВ при разных способах культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

БАВ биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 не проявляют антагонизма к тест-культурам, а наоборот стимулируют их рост. Подобное наблюдалось как при

гетерофазном поверхностном – ускорение роста на 80%, так и при гетерофазном глубинном – ускорение роста на 105%, культивировании.

Культуральная жидкость продуцента имеет выраженный антагонизм к чувствительным тест-культурам, замедляя их рост. Наименьшего значения показатель достиг в опыте с БАВ после гетерофазного глубинного культивирования – замедление роста на 80%. Препарат культуральной жидкости после гетерофазного поверхностного культивирования замедляет рост лишь на 40%.

Таким образом, было показано, что культуральная жидкость *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 может быть использована как источник БАВ, обладающих наибольшим антагонизмом в отношении чувствительных тест-культур.

#### **3.4.2 Выбор экстрагента и условий извлечения БАВ из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434**

При выборе экстрагента руководствовались следующими критериями: не токсичен, не смешивается с водой, отделяется от целевого продукта без потери активности последнего. Согласно требованиям, наиболее подходящими являются этилацетат (ЛД<sub>50</sub> 11,6 г/кг; 12 г на 100 мл;  $t_{\text{кип}}$  77,1 °С) и бутанол (LD<sub>50</sub> 2,290-4,360 мг/кг; 7,9 г на 100 мл;  $t_{\text{кип}}$  117,4 °С).

Выделение БАВ *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающих антагонизмом в отношении чувствительных тест-культур, производили одноступенчатой смесительно-отстойной экстракцией, за счет массообмена между культуральной жидкостью и экстрагентом, в котором концентрировали целевой продукт.

Для освобождения экстракта от экстрагентов наиболее эффективным способом является перегонка с концентрированием целевого продукта в емкости-испарителе. Для сохранения активности экстракта, понижали температуру кипения экстрагента за счет вакуумирования системы: при давлении -0,1 мПа этилацетат закипает при  $T < 40^\circ\text{C}$ , а бутанол  $T > 60^\circ\text{C}$ .

Чувствительность тест-культур к экстрактам культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, полученным при извлечении этилацетатом и

бутанолом показана на рисунке 14.

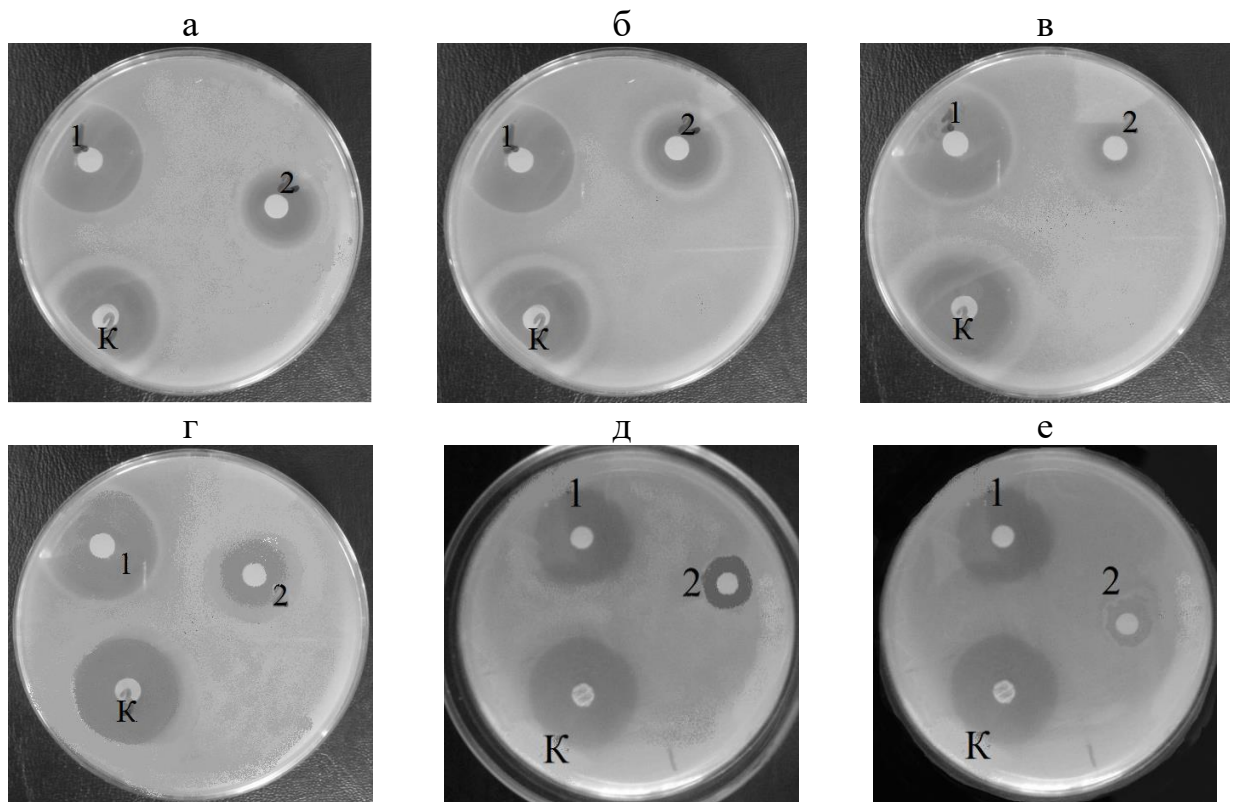


Рисунок 14 – Чувствительность микроорганизмов к экстракту культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Экстрагенты: 1 – этилацетат; 2 – бутанол. К – ципрофлоксацин.

Тест-культуры: а – *E. coli* ATCC 25922; б – *H. alvei* ATCC 11604; в – *K. pneumoniae* ATCC 13883; г – *P. vulgaris* ATCC 13315; д – *S. enteritidis* ATCC 13076; е – *Y. enterocolitica* ATCC 27739.

Этилацетатный экстракт угнетает рост тест-культур со средним значением диаметра зон на 14,29% меньше, чем у контрольного образца – ципрофлоксацина. Бутанольный экстракт угнетает рост тест-культур со средним значением диаметра зон на 46,86% меньше, чем у ципрофлоксацина и на 32,57% – этилацетата. Данное явление можно объяснить селективностью спирта в отношении БАВ продуцента, а также наличием в экстракте термолабильных компонентов, которые теряют активность в процессе перегонки при заданных условиях.

На основании изложенного выше, этилацетат был выбран для выделения БАВ из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Для подбора режима экстракции, обеспечивающего полноту извлечения БАВ был реализован ряд экспериментов с варьированием пропорций {[культуральная жидкость]:[экстрагент]} и продолжительности экстрагирования

(таблица 18).

Таблица 18. Полнота извлечения БАВ *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Параметры	Этилацетат : культуральная жидкость					
	2:1	1:1	0,75:1	1:2	1:3	1:5
720	100	100	100	100	69	45
360	100	100	99	75	51	30
180	100	100	82	61	45	30
120	100	90	74	54	37	30
60	76	59	53	44	30	30
30	51	49	37	30	30	30

Таким образом, установлено, что максимальное извлечение целевого продукта обеспечивается при взаимодействии равных объемов экстрагента и культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в течение 180 минут.

### 3.5 Получение, изучение свойств и состава экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

#### 3.5.1 Извлечение БАВ экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Культуральную жидкость отделяли от биомассы продуцента центрифугированием и последовательной фильтрацией через марлевый, бумажный и мембранный фильтры. Фильтрат культуральной жидкости соединяли с равным объемом этилацетата и перемешивали 180 минут [42].

По завершению экстракции смесь переливали в делительную воронку и отстаивали до разделения слоев. Органический слой отделяли и направляли в ротационный испаритель, где концентрировали при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , с частотой вращения  $60 \pm 5 \text{ мин}^{-1}$  до получения маслянистой жидкости. При необходимости в испарительную колбу вносили достаточное количество экстрагента, чтобы механически смыть и растворить полученный экстракт и количественно перенести его в посуду для сушки. Экстракт замораживали при  $-58^\circ\text{C}$ , отключали охлаждение и сушили до полного удаления этилацетата в лиофильной сушке с давлением  $2,5 \times 10^{-3}$  бар, доводя температуру до  $20^\circ\text{C}$

естественным путем. Из абсолютно сухого экстракта готовили стандартный образец, для чего навеску экстракта растворяли в 96% этаноле в соотношении 1 мл спирта на 1 мг сухого экстракта [97].

### 3.5.2 Физические, химические и биологические свойства экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

*Внешний вид:* абсолютно сухой экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 имеет вид хлопьев, матовых с вариацией цвета от желто-оранжевого до коричневого.

*Температура плавления* абсолютно сухого экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 ( $T_{пл}$ )  $118 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Растворимость.* Абсолютно сухой экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 очень легко растворим в: 1,2-дихлорэтане, ацетоне, ацетонитриле, диметилсульфоксиде, дихлорметане, метаноле, этаноле; легко растворим в: бутаноле, изопропанол, хлороформе; растворим в: бензоле, петролейном эфире, тетрахлорметане, толуоле, уксусной кислоте, этилацетате, эфире диэтиловом (рисунок 15).

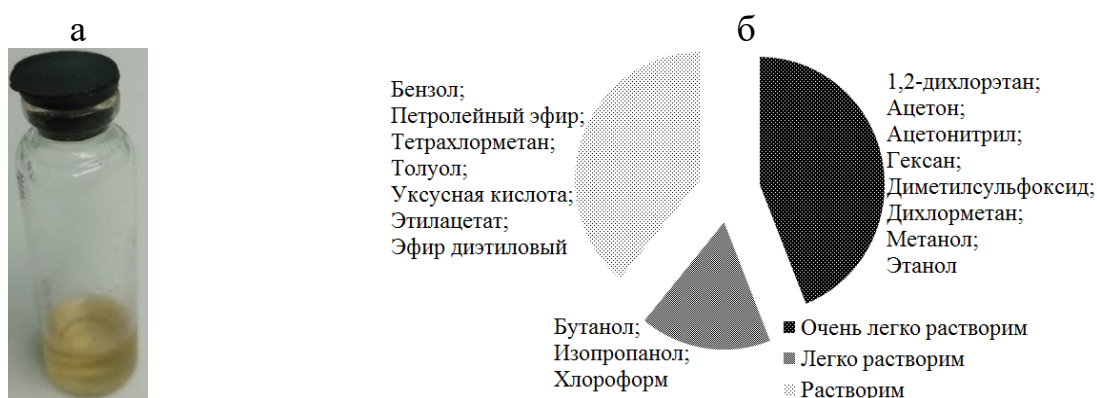


Рисунок 15: а – стандартный образец; б – элюотропный ряд экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

*Плотность* [104]: стандартный образец экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 имеет относительную плотность по воде при температуре  $20^\circ\text{C}$ :  $d_{20}^{20} = 0,00083$ , откуда плотность стандартного образца имеет значение:  $\rho_{20} = 0,8350 \text{ г/см}^3$ .



Коэффициент преломления [105] стандартного образца экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 получил значение:  $n_D^{20} = 1,3602$ .

Удельный показатель поглощения стандартного образца экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 получил значение  $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 625$ .

Максимум поглощения [106] стандартного образца экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 определили при длине волны 275 нм, вторая производная спектра представлена на рисунке 16.

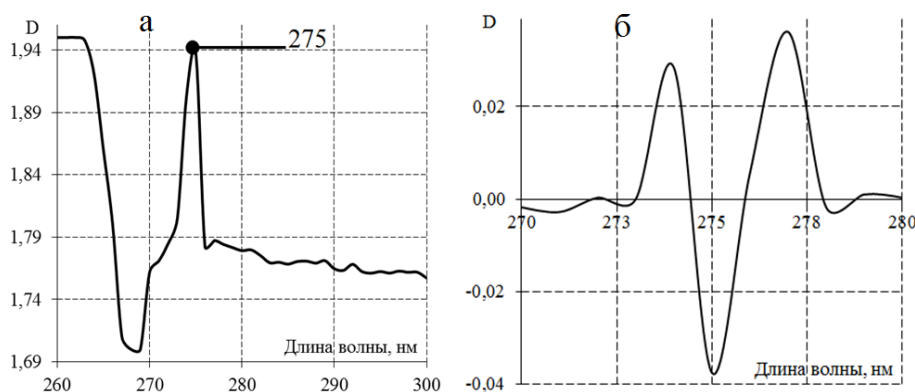


Рисунок 16. Оптические характеристики экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434:

а – УФ-спектр и максимум поглощения; б – вторая производной спектра

Химические свойства [108] стандартного образца экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (таблица 19) На основании реакций преципитации, коагуляции и осаждения (1, 2, 3) можно сделать заключение, что экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 имеет белковую природу; установлено наличие  $\alpha$ -аминогрупп (5) и карбоксильных групп (6, 7). Положительная реакция обесцвечивания бромной воды (8) и отрицательная реакция обесцвечивания перманганата калия (9) свидетельствуют о наличии двойной C=C связи в радикале, что подтверждается ксантопротеиновой реакцией (10) на присутствие ароматических групп. Положительная реакция Адамкевича (11), а также реакция с реактивом Драгендорфа в модификации Мунье (3), говорящая о наличии гетероциклического азотсодержащего соединения, свидетельствуют о наличии триптофана. Положительные реакции с Coomassie .

Таблица 19. Химические свойства стандартного образца экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

№	Реакция		Наблюдение	Результат
1	белок	Преципитации с сульфосалициловой кислотой	Реакционная смесь мутнеет.	*pos
2		Преципитации с реактивом Ларионовой	Помутнение в виде кольца на границе фаз.	pos
3		Осаждения с реактивом Драгендорфа (Мунье)	Выпадает аморфный осадок	pos
4	пептидная связь	Комплексообразования с биуретовым реактивом	Реакционная смесь окрашивается в темно-синий цвет.	**n.d.
5	$\alpha$ -NH <sub>2</sub> группа	Комплексообразования с нингидрином	Реакционная смесь окрашивается в фиолетовый цвет.	pos
6	-COOH группа	Комплексообразования с железа (III) хлоридом	Реакционная смесь окрашивается в красно-бурый цвет, исчезающий при добавлении разведенных минеральных кислот.	pos
7		Этерификации с этанолом	Наблюдалось появление характерного запаха этилацетата.	pos
8	C=C связь	Обесцвечивание бромной воды	Реакционная смесь обесцвечивается.	pos
9		Обесцвечивание перманганата калия	Окраска реакционной смеси не меняется.	***neg
10	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - группа	Ксантопротеиновая	Реакционная смесь окрашивается в ярко желтый цвет, который меняется на оранжевый при добавлении щелочи.	pos
11	триптофан	Адамкевича	На границе фаз наблюдалось красно-фиолетовое кольцо.	pos
12	аргинин	Комплексообразования с Coomassie Brilliant Blue G-250	Реакционная смесь окрашивается в голубой цвет.	pos
13		Сакагучи	Реакционная смесь окрашивается в красный цвет.	pos

\*pos – положительный результат, \*\* n.d. – неопределяемый результат. \*\*\*– neg – отрицательный результат



Brilliant Blue G-250 (12) и Адамкевича (13) подтверждают наличие аргинина. Не определяемый результат биуретовой реакции можно объяснить высоким порогом чувствительности.

### 3.5.3 Определение бактериостатического типа активности экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Ранее был установлен спектр антагонизма агаровых блоков с живой культурой *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Для определения чувствительности представителей кишечного микробиома к экстракту культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 бумажные диски нагружали из расчета 100 мкг/диск в пересчете на абсолютно сухой экстракт [38]. Выбор дозировки любого антибиотического препарата основан на знании концентрации субстанции, необходимой для подавления роста микроорганизма – минимальная ингибирующая концентрация (МИК). Для определения МИК экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 был реализован ряд экспериментов с серийными разведениями (таблица 20).

Таблица 20. Чувствительность тест-культур к экстракту культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Тест-культура	Ø	МИК	СубИК	рабочая
	мм	мг/мл		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	19,19±0,53	13,89±0,26	10	30×10 <sup>2</sup>
<i>H. alvei</i> ATCC 11604	17,97±0,49	19,73±0,24	14	
<i>K. pneumonia</i> ATCC 13883	15,88±0,63	38,86±0,67	29	
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	15,32±0,82	34,01±0,63	25	
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	14,09±0,41	49,31±0,35	36	
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27739	14,94±0,34	26,97±0,58	20	

Для чувствительный тест-культур каждого определяли продолжительность lag-фазы, формула 21 [226] в присутствии 3/4 МИК – субингибирующей концентрации

$$T_{lag} = T_x - \frac{\ln X - \ln X_0}{\mu} \quad (21)$$

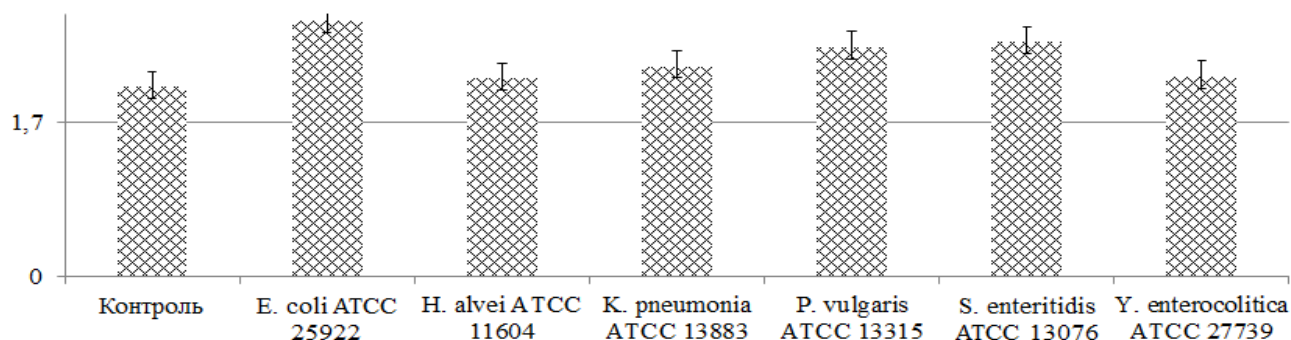


Рисунок 17. Влияние СубМИК экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на продолжительность lag-фазы чувствительных тест-культур

При культивировании чувствительных штаммов в присутствии субингибирующей концентрации экстракта культуральной жидкости наблюдалось удлинение *lag*-фазы в среднем на 17%, максимальное значение определено в эксперименте с *E. coli* ATCC 25922 – 35%, что доказывает бактериостатический тип активности экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 [7].

### 3.5.4 Анализ состава экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Для изолирования активных компонентов экстракта использовали тонкослойную хроматографию [107]. Элюенты для ТСХ выбирали по величине дисперсии линейного взаимодействия элементарных признаков:  $Z_1$  – диэлектрическая проницаемость;  $Z_2$  – дипольный момент;  $Z_3$  – растворимость экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (таблица 21).

В таблице выполняли автошкалирование исходных данных по формуле 22:

$$\dot{Z}_i = \frac{Z_j - \bar{Z}_j}{\sigma_j} \quad (22).$$

Получали центрировано-нормирование данные, на основании которых определяли дисперсии по формуле 23:

$$S_i^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m (\dot{Z}_i - \dot{\bar{Z}}_i)^2 \quad (23)$$

Таблица 21. Элементарные признаки исследуемых факторов

$X_i$	Объекты	Элементарные признаки			Автошкалирование			$S_i^2$
		$Z_1$	$Z_2$	$Z_3$	$\bar{Z}_1$	$\bar{Z}_2$	$\bar{Z}_3$	
1	1,2-дихлорэтан	10,36	1,27	1	-0,25	-0,16	-0,93	0,18
2	Ацетон	20,7	2,85	1	0,50	1,15	-0,93	1,14
3	Ацетонитрил	37,5	3,92	1	1,73	2,04	-0,93	2,67
4	Бензол	2,27	0	30	-0,84	-1,22	1,18	1,67
5	Бутанол	17,8	1,63	10	0,29	0,14	-0,28	0,09
6	Гексан	1,9	0	1	-0,87	-1,22	-0,93	0,03
7	Диметилсульфоксид	46,7	3,96	1	2,40	2,07	-0,93	3,37
8	Дихлорметан	8,93	1,62	1	-0,36	0,13	-0,93	0,28
9	Изопропанол	17,9	1,63	10	0,30	0,14	-0,28	0,09
10	Метанол	32,6	1,65	1	1,37	0,15	-0,93	1,32
11	Петролейный эфир	1,9	0	30	-0,87	-1,22	1,18	1,68
12	Тетрахлорметан	2,24	0	30	-0,85	-1,22	1,18	1,67
13	Толуол	2,38	0,37	30	-0,84	-0,91	1,18	1,41
14	Уксусная кислота	6,15	1,74	30	-0,56	0,23	1,18	0,76
15	Хлороформ	4,81	1,06	10	-0,66	-0,34	-0,28	0,04
16	Этанол	24,5	1,68	1	0,78	0,18	-0,93	0,75
17	Этилацетат	6,02	1,81	30	-0,57	0,29	1,18	0,77
18	Эфир диэтиловый	4,33	1,17	30	-0,69	-0,24	1,18	0,96
	$\bar{Z}_j$	13,83	1,46	13,78				
	$\sigma_j$	13,72	1,20	13,70				
	$\bar{Z}_j$				0	0	0	
	$S_j^2$				1	1	1	

Значимость дисперсий линейных взаимодействий элементарных признаков определяли по величине собственных чисел корреляционной матрицы  $R$  центрировано-нормированных элементарных признаков:

$$R = \begin{vmatrix} S_1^2 & r_{12} & r_{13} \\ r_{21} & S_2^2 & r_{23} \\ r_{31} & r_{32} & S_3^2 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 1 & 0,685 & -0,618 \\ 0,685 & 1 & -0,526 \\ -0,618 & -0,526 & 1 \end{vmatrix}$$

На основании корреляционной матрицы составляли и решали характеристическое уравнение. Уравнение имеет ненулевое решение, когда значение определителя матрицы  $\det(R - \lambda E) = 0$ .

$$\begin{aligned} \det(R - \lambda E) &= \begin{vmatrix} 1 - \lambda & 0,685 & -0,618 \\ 0,685 & 1 - \lambda & -0,526 \\ -0,618 & -0,526 & 1 - \lambda \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 1 - \lambda & \frac{137}{200} & \frac{-309}{500} \\ \frac{137}{200} & 1 - \lambda & \frac{-263}{500} \\ \frac{-309}{500} & \frac{-263}{500} & 1 - \lambda \end{vmatrix} = \\ &= -\lambda^3 + 3\lambda^2 - \frac{74887}{40000} \cdot \lambda + \frac{3968977}{12500000} = \\ &= -\frac{1}{25000000} \cdot (25000000\lambda^3 - 75000000\lambda^2 + 46804375\lambda) = \\ &= -(\lambda - 0,297) \cdot (\lambda - 0,482) \cdot (\lambda - 2,222) = 0 \end{aligned}$$

В итоге получали значения собственных чисел матрицы  $R$ :  $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3$

$$\lambda_1 = 2,222$$

$$\lambda_2 = 0,482$$

$$\lambda_3 = 0,297$$

Дисперсии распределяли в 3 группы: I > II > III, со значениями:  $S_i^2 < 1$ ;  $1 < S_i^2 < 2$ ;  $2 < S_i^2$  и соответствующими  $\lambda_i$ . Значимость дисперсий определяли по формуле 24:

$$I_{S_i^2} = \frac{\lambda_i}{\sum_{i=1}^N \lambda_i} \times 100 \quad (24)$$

Значимыми принимались дисперсии, величина вклада которых превысила 20%:  $I_{S_i^2} > 20\%$ . Результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Выбор элюентов для ТСХ

$S_i^2$	Группа I		Группа II						Группа III									
	2,67	3,37	1,14	1,32	1,41	1,67	1,67	1,68	0,03	0,04	0,09	0,09	0,18	0,28	0,75	0,76	0,77	0,96
$X_i$	3	7	2	10	13	4	12	11	6	15	5	9	1	8	16	14	17	18
Объекты	Ацетонитрил	Диметил-сульфоксид	Ацетон	Метанол	Толуол	Бензол	Тетрахлор-метан	Петролейный эфир	Гексан	Хлороформ	Бутанол	Изопропанол	1,2-дихлор-этан	Дихлорметан	Этанол	Уксусная кислота	Этилцетат	Эфир диэтиловый
$\lambda_i$	2,222		0,482						0,297									
$I_{S_i^2}, \%$	74		16						10									

В работу принимали элюенты с максимально значимой и минимально значимой дисперсиями:  $S_{\max}^2 = 3,37$  – диметилсульфоксид;  $S_{\min}^2 = 0,03$  – гексан.

На основании физико-химических свойств экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 систему составляли по принципу

распределительной хроматографии: подвижная фаза – гексан : ДМСО  
неподвижная фаза – силикагель, импрегнированный метанолом при давлении  $2,5 \times 10^{-3}$  бар.

При распределительном хроматографировании в опытах, где подвижная фаза представляла собой смесь гексана и ДМСО в соотношениях от 7:3 до 1:10 наблюдалось обособление 6–13 фракций. Наиболее четкое разделение наблюдалось в системе элюентов 6:4, которую повторно использовали для эксперимента на пластинах  $2 \times 20$ ,  $3 \times 15$ ,  $5 \times 10$ .

В результате получали хроматограммы, разрешение которых варьировалось в зависимости от длины пластины. Т.к. фракции формировались на расстоянии 1,5–2 см от линии фронта, целесообразно ограничить длину пластины до 10 см, что позволило использовать стандартные чашки Петри для определения фракций с бактериостатической активностью и расчета  $R_f$  (рисунок 18).

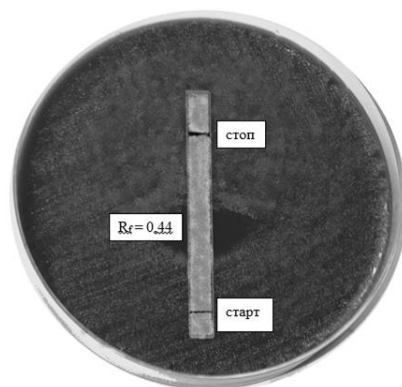


Рисунок 18. Биоавтография экстракта из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на тест-культуре *E. coli*

Таким образом, в условиях, подобранных в ходе эксперимента, было вычислено значение  $R_f$  бактериостатической фракции в зоне угнетения роста *E. coli* равное 0,44.

При препаративном получении компонентов экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, были изолированы три фракции, обладающие наибольшим поглощением при заданных параметрах разделения (рисунок 19).

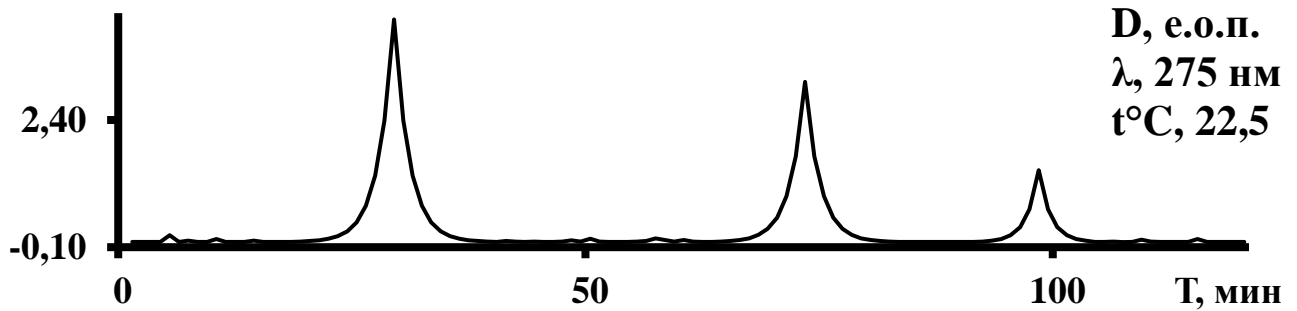


Рисунок 19. Хроматограмма этилацетатного экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Методом биоавтографии была подтверждена бактериостатическая активность каждой фракции. Для контроля определения методом ТСХ были рассчитаны  $R_f$  и теоретически вычислены молекулярные массы фракций. В качестве стандартов молекулярных масс использовали адреналин – 183 Да; L-тироксин – 798 Да; окситоцин – 1007 Да (таблица 23).

Таблица 23. Расчет теоретической молекулярной массы фракций

№	$T_{\text{удерж.}}$ МИН	$h_{\text{пика,}}$ е.о.п.	$W_{1/2}$	$S_{\text{пика}}$	$\omega, \%$	$m/z$	$R_f$	$M_{\text{теор.}}$ Да
1	24	4,38	5,05	22,12	53,23	859,6111	0,28	856
2	69	3,15	4,41	13,89	33,43	739,6093	0,33	726
3	95	1,41	3,93	5,54	13,34	391,2757	0,61	392

Фракции из экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 имеют соотношение 53,2:33,43:13,34. Для них определяли спектр биологической активности как индивидуально, так и в комбинациях между собой (таблица 24).

Также как и экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обособленные компоненты обладают собственной антибиотической активностью -  $K_A$ : «1» 12,31; «2» 10,18; «3» 9,68. Следует отметить, что самостоятельно компоненты экстракта намного проигрывают оригинальному экстракту по значению коэффициента антибиотической активности: «1» -25%; «2» -38%; «3» -41%. То же наблюдается и при парном взаимодействии фракций (1:1): чувствительность тест-культуры меньше на «1+2» -12%, «1+3» -19%, «2+3» -31%. Чувствительность тест-

культур к сумме всех фракций (1:1:1) на 3% меньше, чем к экстракту культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, что дает повод отказаться от фракционирования и использовать оригинальный экстракт культуральной жидкости.

Таблица 24. Спектр антибиотической активности компонентов экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Тест-культура ↓	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>H. alvei</i> ATCC 11604	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27739	K <sub>A</sub>
№ фракции ↓	Ø зоны подавления роста, мм						
экстракт	19,01 ±0,64	18,15 ±0,75	15,99 ±0,13	16,87 ±0,94	14,56 ±0,37	13,89 ±0,49	16,41
1	14,26 ±0,48	13,61 ±0,56	11,99 ±0,10	12,65 ±0,71	10,92 ±0,28	10,42 ±0,37	12,31
2	11,79 ±0,40	11,25 ±0,47	9,91 ±0,08	10,46 ±0,58	9,03 ±0,23	8,61 ±0,30	10,18
3	11,22 ±0,38	10,71 ±0,44	9,43 ±0,08	9,95 ±0,55	8,59 ±0,22	8,20 ±0,29	9,68
1+2	16,73 ±0,56	15,97 ±0,66	14,07 ±0,11	14,85 ±0,83	12,81 ±0,33	12,22 ±0,43	14,44
1+3	15,40 ±0,52	14,70 ±0,61	12,95 ±0,11	13,66 ±0,76	11,79 ±0,30	11,25 ±0,40	13,29
2+3	13,12 ±0,44	12,52 ±0,52	11,03 ±0,09	11,64 ±0,65	10,05 ±0,26	9,58 ±0,34	11,32
1+2+3	18,44 ±0,62	17,61 ±0,73	15,51 ±0,13	16,36 ±0,91	14,12 ±0,36	13,47 ±0,48	15,92
K <sub>S</sub>	14,99	14,32	12,61	13,31	11,48	10,96	

Можно предположить, что в экстракте культуральной жидкости присутствуют структуры, которые невозможно выделить заявленными методами. При этом их влияние очевидно, т.к. чувствительность тест-культур к сумме фракций с подтвержденной антибиотической активностью меньше, чем у оригинального экстракта [42].

Таким образом, проведен анализ экстракта культуральной жидкости и его компонентов, показана степень их эффективности в отношении чувствительных тест-культур. Экстракт культуральной выбран целевым продуктом глубинного

культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

### 3.6 Оптимизация условий глубинного культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Оптимизацию условий глубинного культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 производили с целью увеличения выхода бактериостатических метаболитов. Процедура состояла из двух этапов: 1 – определение математической модели процесса [92]; 2 – установление экстремального отклика методом крутого восхождения.

В эксперименте использовали основу среды CZA («Чапек»), модифицированную на предыдущих этапах:  $\text{Na}_2\text{NO}_3$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5, KCL – 0,5;  $\text{FeSO}_4$  – 0,01; L-аргинин – 1,0; Na-цитрат – 1,0.

#### 3.6.1 Определение математической модели процесса культивирования

Для определения математической модели процесса глубинного культивирования был реализован полный факторный эксперимент типа  $N = 2^k$  (таблица 25).

Таблица 25. Полный факторный эксперимент для подбора условий глубинного культивирования

$k$	$N$	$m$	$P$
число факторов	число опытов	параллельные опыты	доверительная вероятность
3	8	9	0,95

Посевную дозу продуцента, выраженную через стандарт мутности по McFarland, варьировали в пределах, позволяющих четко дифференцировать все стадии роста. За минимальное значение принимали рекомендованное методикой определения чувствительности к АБП – 1 единица мутности по McFarland [93]. Максимальное значение получали по формуле 25:

$$\text{КОЕ} = \frac{V_m}{q} = \frac{70,58}{0,059} = 1,2 \times 10^3 \quad (25),$$



а в пересчете на 30 грамм сахарозы получали  $\approx 5 \times 10^2$  КОЕ. При поверхностном культивировании *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 установлено, что показатель степени инокулята соответствует единицам мутности суспензии по стандарту McFarland. Следовательно верхнее значение фактора – 2.

Пределом продолжительность культивирования был момент активного спороношения, который приходился на 5-6 день.

Пределы варьирования концентрацией сахарозы, определяли на основании результатов поверхностного культивирования продуцента на средах, содержащих сахарозу (г/л): CZA – 30 и NSA – 0,2. При различии концентрации единственного источника углерода в 150 раз была установлена относительно одинаковая скорость роста продуцента на плотной питательной среде. Для сокращения столь значимого различия, нижним уровнем было принято среднее округленное значение рецептурных навесок сахарозы в двух средах – 15 г/л.

Продуцента культивировали при температуре 31 °С, перемешивание (150 – 250 мин<sup>-1</sup>) и аэрация (max = 100%, при 0,5 бар) контролировались программой ферментера автоматически, поддерживая  $pO_2 \geq 80\%$ , pH контролировались автоматически, поддерживая диапазон 7,4±0,2.

Экстракт культуральной жидкости получали согласно установленным параметрам. Определяли диаметр зоны угнетения роста *E. coli* ATCC 25922 экстрактом культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (таблица 26).

Таблица 26. Результаты эксперимента и значимость коэффициентов

№	Отклик						Коэффициенты						
	$\bar{y}_j$ , мм	$\sigma$	$S^2_j$	$G_{расч}$	$G_{табл}$	$S^2_y$	$b_i$	$S^2_b$	$S_b$	$f_2$	$t_{табл}$	$\Delta b_j$	
1	21,89	1,05	1,11	0,38	0,43	10,91	$b_0$	16,44	1,36	1,17	64	1,67	1,95
2	19,78	1,30	1,69				$b_1$	-0,56					
3	18,56	1,33	1,78				$b_2$	-1,06					
4	16,56	3,09	9,53				$b_3$	-1,75					
5	14,22	1,79	3,19				$b_{12}$	0,00					
6	14,11	1,36	1,86				$b_{13}$	0,47					
7	13,33	1,73	3,00				$b_{23}$	0,58					
8	13,11	1,76	3,11				$b_{123}$	-0,03					

Так как экспериментальное значение критерия Кохрена также не превышает табличного значения, подтверждается гипотеза об однородности дисперсий, следовательно, опыты считаются воспроизводимыми. Коэффициенты при факторах и их взаимодействиях статистически незначимы, так как модуль их расчетного значения меньше произведения дисперсии коэффициентов и критерия Стьюдента. Статистическая незначимость коэффициентов может быть вызвана близостью уровня базового режима факторов или их взаимодействий к точке частного экстремума, т.е. находиться в почти стационарной области [34].

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* ATCC 25922, ( $r = -0,98$ ) (рисунок 20).

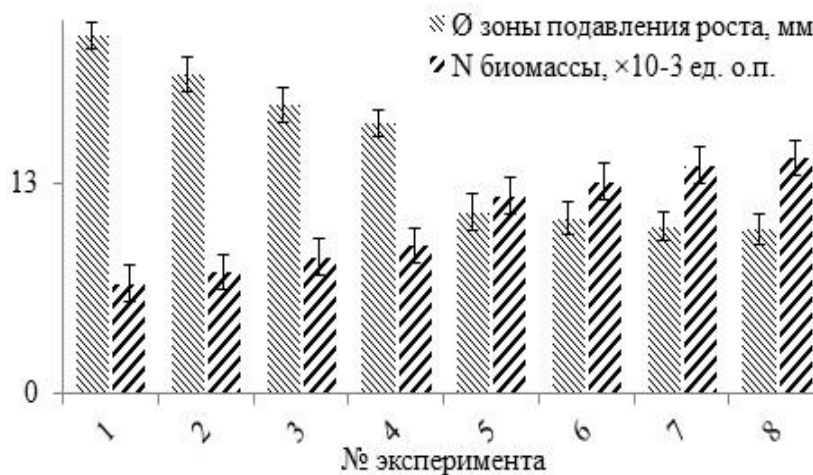


Рисунок 20. Зависимость между приростом биомассы *T. atrobrunneum* F-1434 и диаметром зоны подавления роста *E. coli* ATCC 25922

Для получения модели второго порядка и ее анализа был реализован факторный эксперимент по центральному композиционному ортогональному плану (ЦКОП). Результаты представлены в таблице 27.

Экспериментальное значение критерия Кохрена не превышает табличного значения, подтверждается гипотеза об однородности дисперсий, следовательно, опыты считаются воспроизводимыми.

Таблица 27. Матрица ЦКОП

№	Группы точек	Фактор											Отклик					
		$X_0$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1X_2$	$X_1X_3$	$X_2X_3$	$X_1X_2X_3$	$X_1^2$	$X_2^2$	$X_3^2$	$\bar{y}_i$ , мм	$\sigma$	$S^2_i$	$G_{расч}$	$G_{табл}$	$S^2_y$
1	$N_{ПФЭ}$	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	21,89	1,05	1,11	0,26	0,27	13,71
2		1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	19,78	1,30	1,69			
3		1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	18,56	1,33	1,78			
4		1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	16,56	3,09	9,53			
5		1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	14,22	1,79	3,19			
6		1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	14,11	1,36	1,86			
7		1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	13,33	1,73	3,00			
8		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13,11	1,76	3,11			
9	$N_\alpha$	1	$-\alpha$	0	0	0	0	0	0	$-\alpha^2$	0	0	20,67	1,22	1,50	0,26	0,27	13,71
10		1	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	$\alpha^2$	0	0	10,22	1,09	1,19			
11		1	0	$-\alpha$	0	0	0	0	0	0	$-\alpha^2$	0	19,11	1,17	1,36			
12		1	0	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	$\alpha^2$	0	10,44	1,01	1,03			
13		1	0	0	$-\alpha$	0	0	0	0	0	0	$-\alpha^2$	15,44	1,13	1,28			
14		1	0	0	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	$\alpha^2$	12,11	1,76	3,11			
15	$N_0$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13,56	1,13	1,28			

Выделенные коэффициенты регрессии значимы, так как модуль их расчетного значения больше произведения дисперсии данной группы коэффициентов и критерия Стьюдента (таблица 28).

Таблица 28. Определение коэффициентов регрессии и оценка их значимости

Коэффициенты	$S^2_b$	$S_b$	$f_2$	$t_{табл}$	$\Delta b_j$	
$b_0$	<b>219,56</b>	13,14	3,62	64	1,67	6,05
$b_1$	<b>-1,56</b>	0,14	0,37			0,62
$b_2$	<b>-1,73</b>					
$b_3$	<b>-2,38</b>					
$b_{12}$	0,00	0,19	0,44			0,73
$b_{13}$	0,47					
$b_{23}$	0,58					
$b_{123}$	-0,03					
$b_{11}$	0,56	24,44	4,94			8,25
$b_{22}$	0,40					
$b_{33}$	0,16					

Уравнение регрессии получило вид:  $\bar{y} = 219,56 - 1,56X_1 - 1,73X_2 - 2,38X_3$ . Адекватность полученной модели оценивали по значению критерия Фишера, вычисленному на основании предсказанных результатов эксперимента. Параметры моделирования и оценка адекватности модели ЦКОП представлены в таблице 29.

Таблица 29. Оценка адекватности модели ЦКОП.

№	$\hat{y}_j$	B	$f_1$	$S^2_a$	$F_{расч}$	$F_{табл}$
1	56,31	4	99	18,09	1,32	1,47
2	20,23					
3	20,18					
4	19,81					
5	19,97					
6	19,78					
7	19,77					
8	19,56					
9	20,13					
10	19,79					
11	20,13					
12	19,75					
13	20,17					
14	19,64					
15	-0,07					

Экспериментальное значение критерия Фишера меньше табличного значения – модель адекватно описывает исследуемый процесс культивирования *T. atrobrunneum* F-1434. Исследуемые факторы и их коэффициенты возможно использовать в процедуре оптимизации.

### 3.6.2 Установление экстремального отклика методом крутого восхождения

Основываясь на полученной математической модели, с целью увеличения выхода соединений, обладающих бактериостатической активностью, был реализован эксперимент по оптимизации условий культивирования градиентным методом крутого восхождения (таблица 30).

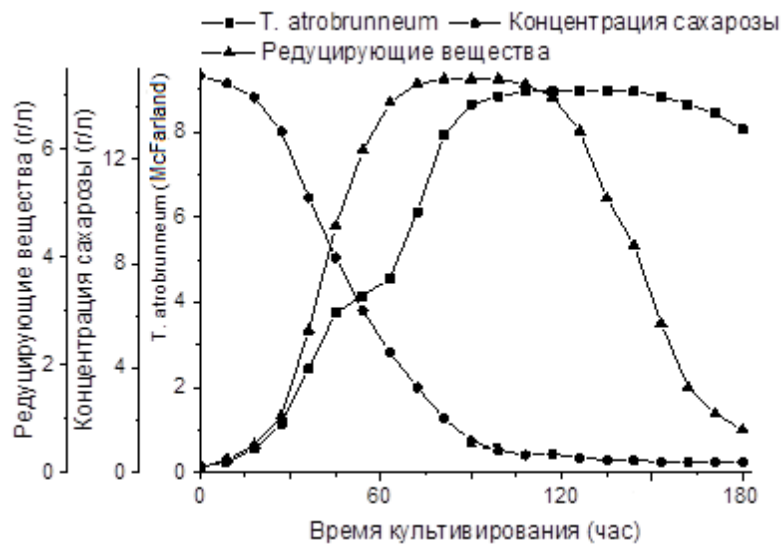
На основании проведенных исследований можно заключить, что крутое восхождение в данном случае оказалось эффективным, так как, сравнивая наилучший результат ЦКОП – 21,89 мм с полученным в реализованном опыте  $^1x_j$  – 22,11 мм, очевидно, что диаметр зоны угнетения роста тест-культуры увеличивается на 0,59%.

Таблица 30. Расчет и реализация крутого восхождения

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

Дальнейшее продолжение оптимизации можно считать нецелесообразным в виду достижения точки экстремума данной функции.

Параметры культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 представлены на рисунке 21.

Рисунок 21. Параметры культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Таким образом, по результатам проведенных экспериментов была разработана оригинальная питательная среда, г/л:

сахароза – 40,34;

$\text{Na}_2\text{NO}_3$  – 2,0;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;

$\text{FeSO}_4$  – 0,001

факторы роста – L-аргинин, Na-цитрат – по 1,0.

А также были оптимизированы условия глубинного культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для получения бактериостатических веществ [43]:

- посевная доза продуцента 2,01 McF;
- температура 31°C;
- $p\text{O}_2 \geq 80\%$ ;
- $p\text{H} 6,3 \pm 0,2$ ;
- продолжительность культивирования 187 часов  $\approx 7,78$  суток;
- перемешивание и аэрация на автоматической регуляции под контролем программы ферментера.

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРОДУКЦИИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *T.*

### *ATROBRUNNEUM* ВКПМ F-1434

На основании разработанного экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 сконструирована лечебно-профилактическая биопродукция ветеринарного и зоотехнического назначения.

#### 4.1 Конструирование бактериостатической композиции на основе экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Учитывая целевое применение экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, возникла необходимость перевести его в водорастворимую форму, преобразованием в прямую дисперсную систему. Разработанная система представляла собой лиофобную эмульсию, полученную за счет акустического диспергирования экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. В качестве дисперсной среды использовали водный раствор натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, благодаря ее способности образовывать с дисперсной фазой действующего компонента устойчивые системы.

Концентрацию экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в бактериостатической композиции (БСК) рассчитывали как стократное значение среднего показателя минимальной ингибирующей концентрации чувствительных тест-культур (см. таблица 20) – 3 г абсолютно сухого экстракта.

Для подбора оптимальной концентрации Na-КМЦ, обеспечивающей стабильность эмульсии и максимальное высвобождение биологически активного компонента был реализован ряд экспериментов с варьированием массы Na-КМЦ (таблица 31).

Согласно результатам таблицы, подавление роста определяется при концентрации загустителя  $\leq 0,5\%$ , однако, в образцах с содержанием  $\leq 0,25\%$  при длительном стоянии наблюдается явление тиксотропии, что говорит о

нестабильности коллоидной системы при установленных концентрациях загустителя. На основании вышеизложенного, целесообразно выбрать оптимальной концентрацию Na-КМЦ, равную 0,5% (w/v).

Таблица 31. Влияние концентрации Na-КМЦ на чувствительность тест-культур к экстракту культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Тест-культуры	Концентрация стабилизатора, %				
	0,125	0,25	0,5	0,75	1,0
	Наличие роста тест-культур				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	+
<i>H. alvei</i> ATCC 11604	-	-	-	-	+
<i>K. pneumonia</i> ATCC 13883	-	-	-	+	+
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	-	-	-	+	+
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	-	-	-	+	+
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27739	-	-	-	+	+

Для подбора оптимальных параметров, обеспечивающих наилучшую гомогенизацию, был поставлен ряд экспериментов с варьированием параметрами диспергирования: амплитуда колебаний звуковода и время импульса (таблица 32).

Таблица 32. Эффективность гомогенизации (%)

Параметры	амплитуда колебаний звуковода, $\mu\text{m}$			
время импульса, мин	5	10	15	20
20	69	100	100	100
15	51	75	100	100
10	45	61	100	100
5	37	54	74	100
1	30	44	53	76

Согласно таблице 28, максимальная однородность бактериостатической композиции достигается за 10 минут при амплитуде колебаний звуковода 15  $\mu\text{m}$  с частотой 23 кГц. Акустическое диспергирование несет в себе преимущества ультразвуковой кавитации, обеспечивающей разрушение и перемешивание фаз, позволяет точно регулировать процесс, сохраняя функциональность биологически активных соединений.



#### 4.1.1 Технология получения бактериостатической композиции

Технологический процесс воспроизводился в условиях ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени Н.В. Парахина».

Ферментационная установка представляла собой реактор идеального смешения, емкость из бор-силикатного стекла с рабочим объемом 3 л, с днищем в форме полусферы. Для предотвращения образования застойных зон в питательной среде, а также для удобства разгрузки установки допускается использовать емкости с усеченным дном, снабженным отводом для слива культуральной жидкости. Для обеспечения максимального массопереноса кислорода использовали комбинацию перемешивания и подачи газовой смеси на дно через сетчатый аэратор.

Для перемешивания питательной среды на валу были установлены импеллерная мешалка с наклонными лопастями, создающая восходящий поток, и две плоско-лопастные мешалки Раштона, создающих распределение в радиальных потоках: в полусфере, на уровне  $1/3$  и  $2/3$  объема - соответственно. Аппаратурная и технологическая схемы представлены на рисунке 22 и 23.

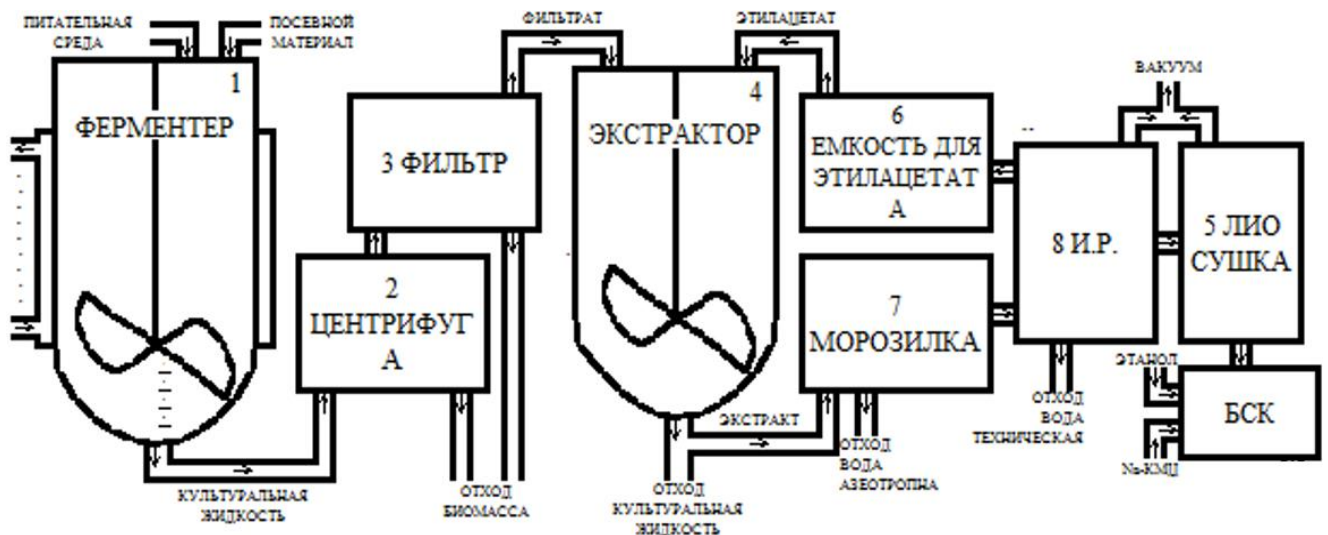


Рисунок 22 – Аппаратурная схема производства бактериостатической композиции

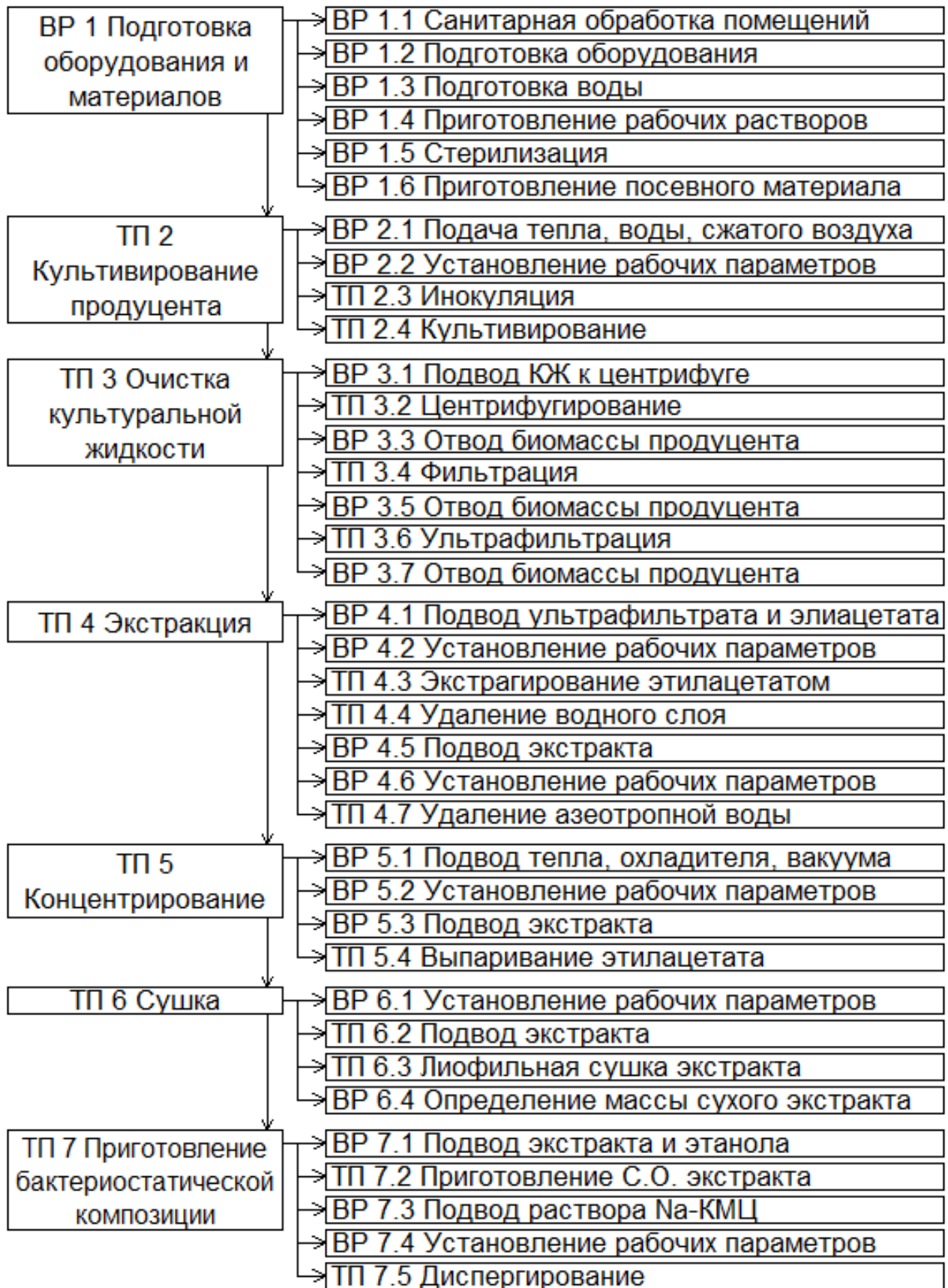


Рисунок 23. Схема производства бактериостатической композиции.

Технологический процесс состоял из 7 стадий:

- подготовка оборудования и материалов;
- культивирование продуцента;
- очистка культуральной жидкости;
- экстракция;
- концентрирование;
- сушка;
- приготовление бактериостатической композиции.

#### ВР.1. Подготовка оборудования и материалов

Стадия вспомогательных работ включает в себя санитарную обработку помещений, подготовку оборудования, материалов и воды. Подготовку воды проводят ГОСТ Р 58144- 2018 для технических нужд и по ФС.2.2.0020.18 для приготовления рабочих растворов; подачу тепла, воды, пара; установление рабочих параметров стерилизации, приготовление посевного материала.

Чистую культуру *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 получали в микробиологической лаборатории в пробирках со скошенным агаром Чапека. Посевной материал готовили суспендированием недельной культуры в изотоническом растворе хлорида натрия, устанавливая мутность 1,5 по стандарту McFarland, вносили в колбы на 100 мл с жидкой средой Чапека в соотношении 1:10, инкубировали при температуре 28 °С и орбитальном перемешивании с частотой 250 мин<sup>-1</sup>.

В емкости ферментера готовили питательную среду содержащую г/л: 4,034% сахарозы; 0,2% натрия азотнокислого; 0,1% калия фосфата однозамещенного; 0,05% магния сернокислого гептагидрата, в системе контроля рН готовили 1N растворы NaOH и HCl, стерилизовали 10 минут при температуре 120 °С, давлении 1 атм. (0,1 мПа).

Инокулят готовили на пятые сутки инкубирования посевного материала, устанавливая изотоническим раствором хлорида натрия мутность 2,1 по стандарту McFarland, в объеме 0,5% v/v от объема питательной среды.

#### ТП. 2. Культивирование продуцента

Стадия включает в себя подачу тепла, воды, сжатого воздуха; установление рабочих параметров; инокуляцию, культивирование с контролем и корректировкой показателей температуры,  $pH$ ,  $pO_2$ , перемешивания.

Культивирование *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 начинали введением инокулята в питательную среду через асептический порт. В течение 187 часов программа ферментера контролировала и автоматически корректировала параметры культивирования в установленных пределах. Температуру  $31 \pm 0,5$  °C поддерживали за счет подачи теплоносителя в термостатирующий блок.  $pO_2 \geq 80\%$  обеспечивали каскадным регулированием перемешивания и аэрации. Постоянное закисление среды нивелировали до значения  $pH$   $7,4 \pm 0,2$  с помощью блока автоматического титрования 1N растворов NaOH и HCl.

### ТП. 3. Очистка культуральной жидкости

Стадия включает в себя подвод культуральной жидкости к центрифуге, отделение супернатанта, фильтрацию, ультрафильтрацию.

Культуральную жидкость отделяли от биомассы продуцента центрифугированием 5 минут с частотой вращения  $6000 \text{ мин}^{-1}$ . Полученный фугат отделяли от неосажденных мелкодисперсных примесей, в том числе спор продуцента на установке, состоящей из колбы Бунзена и воронки Бюхнера., где последовательную фильтровали через бумажный фильтр и через ультрафильтрационные мембраны на основе полисульфонамида («Владипор») под вакуумом - 1 атм.

Отходом в данном технологическом процессе является биомасса продуцента, включая мицелий и конидии *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Полученную биомассу продуцента отмывали от культуральной жидкости, сушили и использовали в качестве компонента биоудобрения для стимуляции роста растений (приложение 11, 12)

### ТП. 4. Экстракция

Стадия включает в себя подвод ультрафильтрата и этилацетата, установление рабочих параметров, перемешивание, отстаивание, удаление водного слоя, установление рабочих параметров (замораживание), удаление

азеотропной воды.

Выделение и очистка биологически активных веществ, обладающих бактериостатической активностью, представляет собой одноступенчатую смесительно-осадительную экстракцию БАВ из культуральной жидкости и включает в себя установление рабочих параметров, экстрагирование этилацетатом 1:1, удаление водной фазы. Из фильтрационной установки фильтрат культуральной жидкости подавали в емкость, где его соединяли с равным объемом этилацетата и перемешивают 180 минут. По завершению массообмена перемешивание останавливали, реакционную смесь переносили в гравитационный отстойник в виде делительной воронки и оставляли до разделения слоев. Нижний водный слой удаляли через слив под контролем зрения. Эфирный слой охлаждали до  $-20^{\circ}\text{C}$  для удаления азеотропной воды.

Отходом в данном технологическом процессе является культуральная жидкость с микропримесями экстрагента. Культуральная жидкость подлежит очистке дистилляцией с получением технической воды, которую возможно вернуть в производство. Сухой остаток не несет биологической опасности и может быть использован в составе минеральных удобрений.

#### ТП. 5. Концентрирование

Стадия включает в себя подвод тепла, охладителя, вакуума и этилацетатного экстракта культуральной жидкости к испарителю, установление рабочих параметров, выпаривание.

Экстракт культуральной жидкости подавали в роторный испаритель автоматически, за счет пониженного давления в аппарате. Упаривание проводили при температуре  $40 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , с частотой вращения  $60 \pm 5 \text{ мин}^{-1}$  до получения маслянистой жидкости. При необходимости в испарительную колбу вносили достаточное количество экстрагента, чтобы механически смыть полученный экстракт и количественно перенести его в посуду для сушки.

Отходом в данном технологическом процессе является этилацетат, содержащий продукт в следовых концентрациях. Отделённый экстрагент направляли на регенерацию, после которой возможно возвращение в процесс для

повторного применения.

#### ТП. 6. Сушка

Стадия включает в себя установление рабочих параметров подвод концентрата, удаление экстрагента до получения сухого экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, определение массы продукта.

Концентрат экстракта инкубировали в конденсоре лиофилизатора при  $-58 \pm 2^\circ \text{C}$  до замерзания и понижали давление до  $2,5 \times 10^{-3}$  бар. При установлении заданных параметров, отключали охлаждения и естественным путем нагревали до полного удаления экстрагента.

Отходом в данном технологическом процессе является этилацетат, который в виде паров удалялся в атмосферу.

Выход абсолютного сухого экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 составил 0,8371 г из 3 литров питательной среды. Внешний вид – желто-оранжевые или коричневые матовые хлопья.

#### ТП. 7. Приготовление бактериостатической композиции

Стадия готовой формы продукта включает в себя установление рабочих параметров, подвод сухого экстракта, этанола и раствора Na-КМЦ, смешивание. Соотношение компонентов представлено в таблице 33.

Таблица 33. Компоненты бактериостатической композиции

СО*			Матрица				
ω	экстракт	этанол	V	V	ω	Na-КМЦ	H <sub>2</sub> O
%	г	мл	мл	мл	%	г	мл
1	1,00	1,00	1,20	до 100	0,5	0,5	до 100
2	2,00	2,00	2,40				
3	3,00	3,00	3,59				
4	4,00	4,00	4,79				
5	5,00	5,00	5,99				
6	6,00	6,00	7,19				

\*СО – стандартный образец экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 [97]

В стерильной емкости готовили стандартный образец экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, для чего к абсолютно сухому экстракту прибавляли 96% этанол в соотношении: на 1 мг экстракта 1 мл

спирта. Матрицу для создания бактериостатической композиции готовили из натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, для чего готовили 0,5% водный раствор, стерилизовали 10 минут автоклавированием при 1 атм., 120°C, охлаждали до 45°C.

Готовую форму бактериостатической композиции получали акустическим диспергированием стандартного образца экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в матрице из Na-КМЦ; продолжительность – 10 минут при амплитуде колебаний звуковода 15 мкм с частотой 23 кГц.

#### Характеристика готового продукта

Готовая бактериостатическая композиция имеет бледно-желтый оттенок, прозрачна и/или слегка опалесцирует. маслянистой консистенции со специфическим запахом. Полученную суспензия разливали и хранили в подготовленной таре.

#### **4.1.2 Оценка безвредности бактериостатической композиции**

С целью обоснования возможности их использования в качестве биопрепаратов для зоотехнии и ветеринарии экстракт культуральной жидкости и бактериостатическая композиция были протестированы по ГОСТ 31647-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности» и ГОСТ 31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности»; ОФС.1.7.2.0001.15 Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo* [113].

1. Микробиологическую чистоту путем посева образца на элективные питательные среды с последующей микроскопией окрашенных по Граму мазков из выросших колоний.

*Критерии оценки микробиологической чистоты.*

Согласно ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» [109], экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 относится к категории 5.2 – «Субстанции для производства биологических лекарственных препаратов,

включая ИЛП»: пункт А – «Для производства стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации». В норме субстанции должны быть стерильны. Карбоксиметилцеллюлоза относится к категории 4.2 – «Вспомогательные вещества», рекомендуемые требования: Общее число аэробных микроорганизмов – не более  $10^3$  КОЕ в 1 г (мл); Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более  $10^2$  КОЕ в 1 г (мл); Отсутствие *E. coli* – в 1 г (мл); Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 25 г (мл); Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл); Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл); Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более  $10^2$  КОЕ в 1 г (мл).

В чашках для выпаривания навески сухих образцов экстракта культуральной жидкости и БКС восстанавливали тройным объемом ацетона, в пересчете на сухую массу. Образцы медленно нагревали до полного удаления запаха растворителя и получения маслянистого остатка желтоватого или коричневого оттенка. В чашку добавляли 2,5 см<sup>3</sup> растительного масла.

#### 2. Определение алергизирующего действия.

*Кожная проба.* Было использовано 3 кролика, с массой 2,5 – 3,0 кг, которым на внутренней поверхности бедра выстригали участок кожи 6×6 см. Стерильным скарификатором делали царапину и наносили каплю исследуемого образца. Оценивали результаты от 30 до 60 минут.

*Критерии оценки алергенности.*

Образец неаллергенный, если на месте нанесения не возникало изменений.

Образец аллергенный, если на месте нанесения возникало покраснение и/или припухлость.

#### 3. Определение местного действия (реактогенности).

*Кожная проба.* Трех кроликам, с массой 2,5 – 3,0 кг на выстриженном участке кожи 6×6 см внешней поверхности бедра подкожно однократно вводили 0,5 мл исследуемого образца. Оценку местного раздражающего действия осуществляли на основании данных осмотров, проводимых в течение последующих семи суток.

#### 4. Оценка токсичности.



*Кожная проба.* Кролику на выстриженный участок кожи 6×6 см, стеклянной лопаткой наносили половину экстракта, вторую половину экстракта наносили через сутки. В качестве контроля использовали такой же участок кожи, на который не наносили экстракт. Наблюдение за реакцией проводили в течение 3 суток, начиная со второго после повторного нанесения экстракта (рисунок 24).



Рисунок 24. Кожная проба на токсичность, кролики

*Критерии оценки токсичности.* Образец нетоксичный, если отсутствует воспалительная реакция кожи. Допускается наличие гиперемии, сохраняющейся не более 2 суток после повторного нанесения экстракта и не сопровождающейся шелушением кожи. Образец токсичный, если наблюдаются гиперемия, сохраняющаяся 3 суток и более после повторного нанесения экстракта на кожу, шелушение, болезненность, уплотнение или отечность кожи, возможны точечные капиллярные кровоизлияния. В случае крайней степени токсичности корма по всей поверхности участка кожи появляются язвы, затем образуется сплошной струп.

*Пероральный тест.* Было использовано 10 белых лабораторных мешей массой 18-20 г каждая, выдержанные без корма в течение 4 часов. Пяти опытным

мышам с помощью шприца с тупой изогнутой иглой длиной вводили однократно через рот в желудок  $0,5 \text{ см}^3$  выпаренного остатка ацетонового экстракта корма. Пяти контрольным мышам вводили растительное масло, которым разводили экстракт. Наблюдали 3 суток, без ограничения в корме и воде. При отсутствии падежа мышей усыпляли медицинским эфиром и вскрывали (рисунок 25).



Рисунок 25. Пероральный тест на токсичность, мыши

*Критерии оценки токсичности.* Образец нетоксичный, если все мыши живы, а при вскрытии убитых мышей патологоанатомических изменений не обнаружено. Образец токсичный, если мыши гибнут все или хотя бы одна мышь, и при вскрытии павших и убитых животных устанавливают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто сопровождающееся дегенерацией печени, почек, селезенки или кровоизлияниями в паренхиматозных органах.

При параллельном анализе на кроликах и мышах нетоксичным считают образец, который окажется нетоксичным в обоих вариантах анализа.

На питательных средах роста микроорганизмов нет. У кроликов 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.

Таким образом, согласно проведенным испытаниям (приложение 9, 10), экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и бактериостатическая композиция нетоксичны, безвредны.

#### 4.1.3 Оценка влияния бактериостатической композиции на эффективность $\beta$ -лактамовых антибиотиков

Используемые в работе микроорганизмы, в частности *Proteus* spp. часто осложняет раневые процессы, например анальные трещины, а так же обладают множественной антибиотикорезистентностью. Ставили ряд опытов при совместном инкубировании бактериостатической композиции с некоторыми  $\beta$ -лактамовыми антибиотиками: амоксициллином, меропенемом, цефазолином. В опыте использовали клинические изоляты кишечной группы: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, проверенные на отсутствие генов резистентности VIM, CTX-M, TEM. В качестве контроля использовали фторхинолон – ципрофлоксацин (рисунок 26).

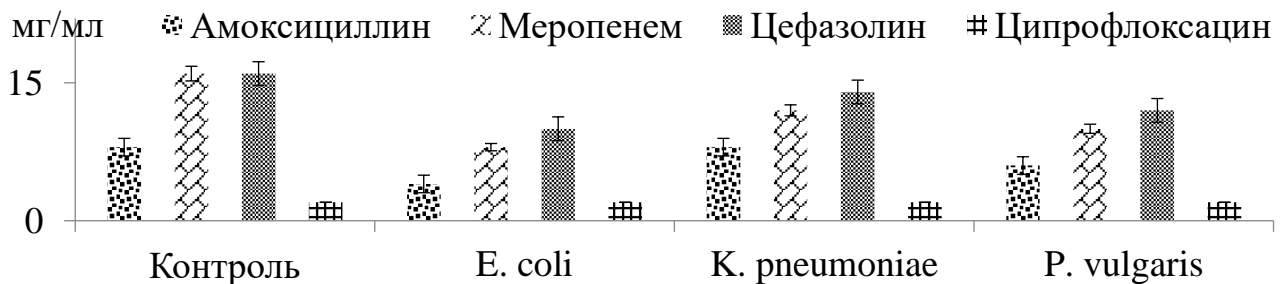


Рисунок 26. Чувствительность тест-культур к  $\beta$ -лактамовым антибиотикам в комбинации с бактериостатической композицией на основе экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

При инкубировании тест-культур с комбинацией антибиотиков и бактериостатической композиции, наблюдалось снижение МИК, что говорит о повышении эффективности антибактериальных препаратов. В отношении *E. coli* - для амоксициллина МИК снизилась на 50%, для меропенема и цефазолина уменьшилась на 25%; в отношении *K. pneumoniae* - для амоксициллина МИК снизилась на 50%, для меропенема и цефазолина уменьшилась на 25%; в

отношении *P. vulgaris* - для амоксициллина МИК снизилась на 50%, для меропенема и цефазолина уменьшилась на 25% [40].

Таким образом, снижение МИК  $\beta$ -лактамовых антибиотиков говорит об увеличении их активности за счет синергизма с экстрактом культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в бактериостатической композиции.

#### 4.1.4 Критерии подлинности экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

*Внешний вид:* вид хлопьев, матовых с вариацией цвета от желто-оранжевого до коричневого.

*Растворимость:* ОЧЕНЬ ЛЕГКО РАСТВОРИМ в: 1,2-дихлорэтане, ацетоне, ацетонитриле, диметилсульфоксиде, дихлорметане, метаноле, этаноле; ЛЕГКО РАСТВОРИМ в: бутаноле, изопропанолем, хлороформе; РАСТВОРИМ в: бензоле, петролейном эфире, тетрахлорметане, толуоле, уксусной кислоте, этилацетате, эфире диэтиловом.

*Температура плавления:*  $T_{пл} = 118 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Плотность СО\*:*  $\rho_{20} = 0,8350 \text{ г/см}^3$ .

*Коэффициент преломления СО\*:*  $n_D^{20} = 1,3602$ .

*Максимум поглощения СО\*:*  $\lambda_{max} = 275 \text{ нм}$ .

*Удельный показатель поглощения СО\*:*  $A_{1 \text{ см}}^{1\%} = 625$ .

*Химические свойства:*

В реакции преципитации с сульфосалициловой кислотой реакционная смесь мутнеет. В реакции преципитации с реактивом Ларионовой наблюдается помутнение в виде кольца на границе фаз. В реакции осаждения с реактивом Драгендорфа (Мунье) выпадает аморфный осадок. В реакции комплексообразования с биуретовым реактивом реакционная смесь окрашивается в темно-синий цвет. В реакции комплексообразования с нингидрином реакционная смесь окрашивается в фиолетовый цвет. В реакции комплексообразования с железа (III) хлоридом реакционная смесь окрашивается в

красно-бурый цвет, исчезающий при добавлении разведенных минеральных кислот. В реакции этерификации с этанолом наблюдалось появление характерного запаха этилацетата. В реакции обесцвечивание бромной воды реакционная смесь обесцвечивается. В реакции обесцвечивание перманганата калия окраска реакционной смеси не меняется. В ксантопротеиновой реакции реакционная смесь окрашивается в ярко желтый цвет, который меняется на оранжевый при добавлении щелочи. В реакции Адамкевича на границе фаз наблюдалось красно-фиолетовое кольцо. В реакции комплексообразования с Coomassie Brilliant Blue G-250 реакционная смесь окрашивается в голубой цвет. В реакции Сакагучи реакционная смесь окрашивается в красный цвет.

*Специфичность.* Экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 ингибирует рост тест-культур: *E. coli* ATCC 25922; *H. alvei* ATCC 11604; *K. pneumonia* ATCC 13883; *P. vulgaris* ATCC 13315; *S. enteritidis* ATCC 13076; *Y. enterocolitica* ATCC 27739. Грам+ бактерии и грибы нечувствительны к экстракту. Бактериостатической активностью обладает фракция с  $R_f 0,44 \pm 0,0097$ .

## **4.2 Конструирование метабиотика на основе бактериостатической композиции**

### **4.2.1 Обоснование выбора компонентов метабиотика**

Метабиотик для коррекции микробиоценоза кишечника представляет собой иммобилизованный на матрице из гидролизного лигнина метабиотик, содержащий комплекс экстрактов из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и консорциума облигатной микробиоты ЖКТ здоровых поросят-отъемышей: *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus*. Действие препарата учитывали по количественной оценке основных показателей нормального микробиоценоза кишечника: количество бифидобактерий, общее количество кишечной палочки, лактозонегативные энтеробактерии, кокковые формы в общей сумме.

Исследовали изменение прироста биомассы маркерных культур в кале 9 кроликов, массой 2,5-3 кг. Кал получали с помощью подкладного судна, откуда

забирали материал, объединяли и гомогенизировали, брали среднюю пробу. Согласно методике [6] «Методические рекомендации «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» готовили серийные разведения фекальной массы, которые делили на 4 серии аликвот. Первую серию аликвот разбавляли равным объемом стерильной воды, использовали в качестве контроля. К оставшимся трем сериям аликвот добавляли равный объем стократного разведения бактериостатической композиции, содержащей 3% экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434; экстракта культуральной жидкости консорциума облигатной микробиоты ЖКТ; смесь бактериостатической композиции и экстракта культуральной жидкости консорциума облигатной микробиоты ЖКТ. Реакционные смеси инкубировали 4 часа лабораторных условиях и производили посев на среды Эндо, Блаурокк и желточно-солевой агар, инкубировали по требованиям культур. Учет результатов производили визуально, определили количество КОЕ в абсолютных единицах. Результаты обобщены на рисунке 27.

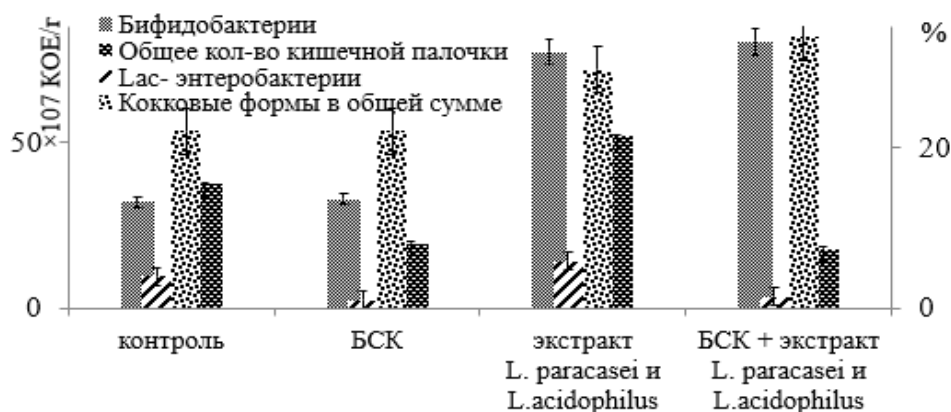


Рисунок 27. Оценка взаимодействия компонентов метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника

Бактериостатическая композиция подавляет рост кишечной палочки, в том числе лактозонегативных энтеробактерий. Так, общее количество кишечной палочки сократилось на 47,8%, число лактозонегативных энтеробактерий снизилось на 77,08% – что характерно для специфичности действия экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 [39].

Экстракт биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ оказал ростостимулирующий эффект на все исследуемые компоненты микробиома. Стоит заметить, что БАВ, выделенные из облигатной микробиоты кишечника, оказывают выраженное стимулирующее действие как на представителей Грам-, так и Грам+ микроорганизмов, включая анаэробы. Количество бифидобактерий увеличилось на 140,83%, в том числе кокковых форм – на 29,66%. Общее количество кишечной палочки выросло на 38,56%, в том числе лактозонегативных энтеробактерий – на 48,28%.

Смесь бактериостатической композиции и экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ обеспечила наибольший прирост биомассы облигатной микробиоты кишечника – бифидобактерий на 150,52%, в том числе кокковых форм – на 33,69%. Общее количество кишечной палочки снизилось на 52,35%, в том числе лактозонегативных энтеробактерий – на 63,64%.

Вероятно, полученное соотношение культур вызвано сочетанным действием компонентов метабиотика, что выражается в сдвиге в сторону увеличения Грам+ микроорганизмов за счет уменьшения количества лактозонегативных энтеробактерий, относящихся к Грам-.

По совокупности результатов можно сделать заключение, что компоненты сконструированного метабиотика способны влиять на состав микробиома кишечника, добиваясь кратного изменения соотношения культур. Это позволяет рекомендовать его для коррекции кишечного микробиоценоза в ветеринарной практике.

#### **4.2.1 Технология получения метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника**

Технологический процесс воспроизводился в условиях лаборатории ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени Н.В. Парахина». Аппаратурная технологические схемы представлены на рисунках 28, 29.



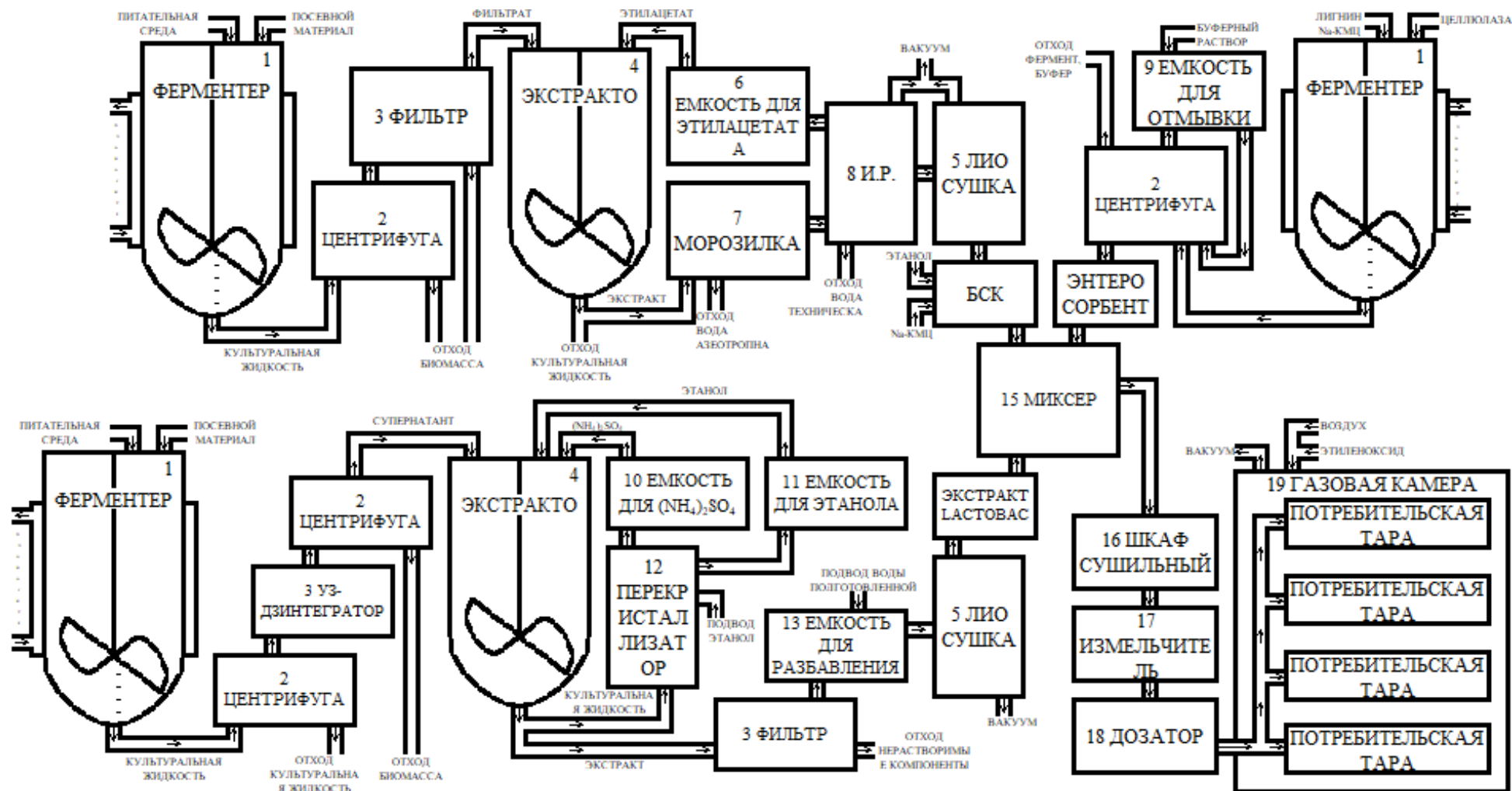


Рисунок 28. Аппаратурная схема производства метаболита для коррекции микробиоценоза кишечника



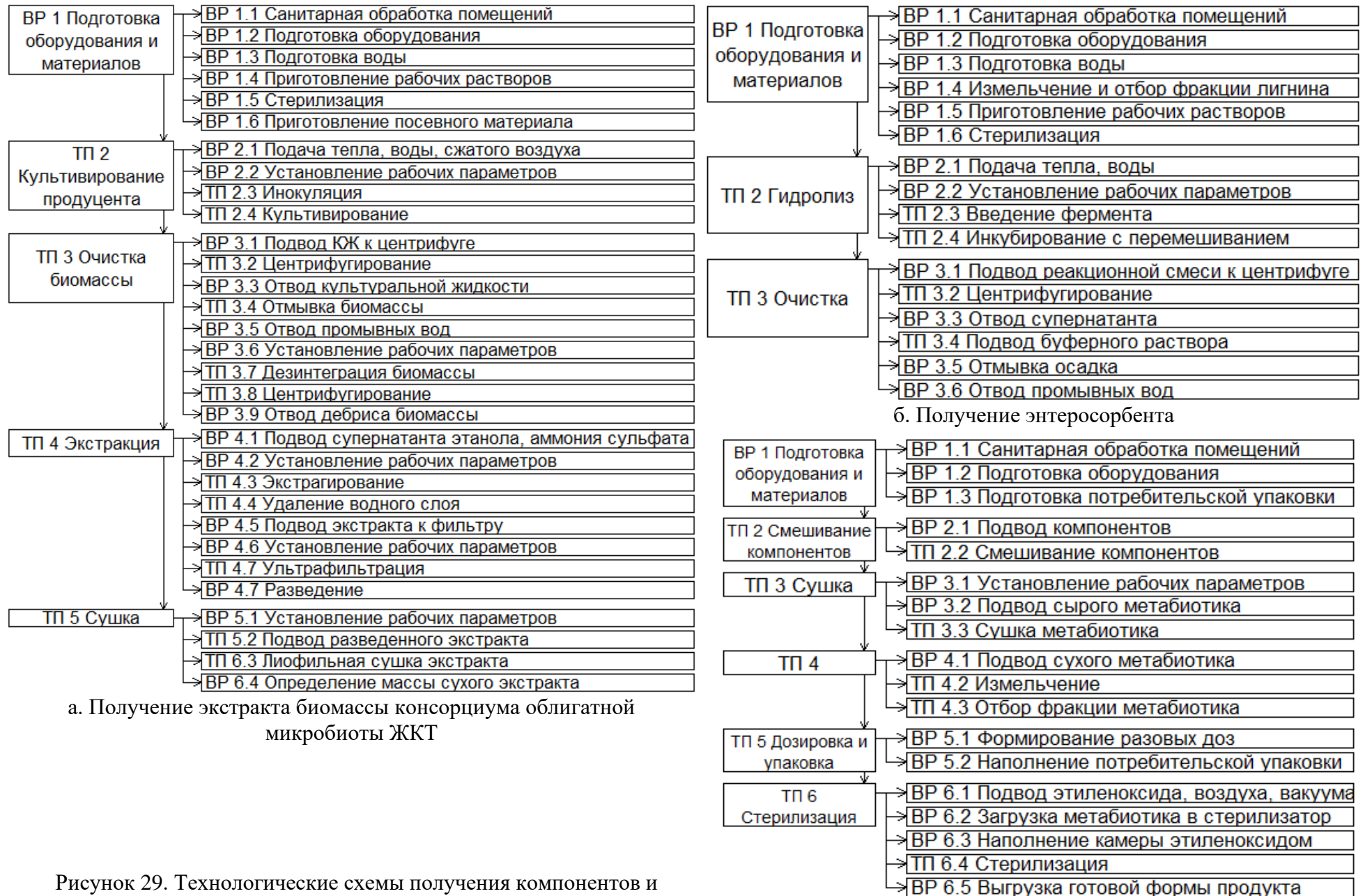


Рисунок 29. Технологические схемы получения компонентов и препарата метабиотика.

в. Приготовление препарата метабиотика

Производство метабиотика имеет 4 стадии:

- I. Получение бактериостатической композиции
- II. Получение экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ;
- III. Получение энтеросорбента;
- IV. Приготовление препарата метабиотика.

I стадия подробно описана в разделе 4.1.

II. Получение экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ. Ферментационная установка представляла собой реактор идеального смешения, емкость из бор-силикатного стекла с рабочим объемом 1,5 л, с плоским дном. Для предотвращения образования застойных зон в питательной среде, а также для удобства разгрузки установки допускается использовать емкости с усеченным дном, снабженным отводом для слива культуральной жидкости. Для создания микроаэрофильных условий питательную среду аэрировали газовой смесью с содержанием  $\text{CO}_2$  10-15%. Для перемешивания питательной среды на нижнем конце вала была установлена одна плоско-лопастная турбина Раштона.

#### ВР.1. Подготовка оборудования и материалов

Стадия вспомогательных работ включает в себя санитарную обработку помещений, подготовку оборудования, материалов и воды (ФС.2.2.0020.18 Вода очищенная). Приготовление рабочих растворов, подачу тепла, воды, пара; установление рабочих параметров стерилизации, приготовление посевного материала.

В емкости ферментера готовили основу среды содержащую: 10% пептона, 40% кукурузного экстракта, разведенного водой в соотношении 1:6, 6% натрия лимоннокислого трехзамещенного, 0,12% магния сернокислого, 2% калия фосфорнокислого двухзамещенного (w/v), в системе контроля pH готовили 1N растворы NaOH и HCl, стерилизовали 10 минут при температуре 120 °C, давлении 1 атм. (0,1 мПа).

При достижении 45°C через асептический порт вводили термолабильный компонент, содержащий концентрат лактозы, цистина солянокислого, аскорбиновой кислоты для достижения концентраций в ферментере 10%, 0,15%,

0,5% соответственно. Устанавливали параметры культивирования. Чистые культуры *L. paracasei* и *L. acidophilus*, получали в микробиологической лаборатории. Посев культуры продуцента проводили в пробирки на скошенный агар MRS, выращивали 48 часа при температуре 31 °С, в инкубаторе с содержанием CO<sub>2</sub> в камере 10 – 15%. Культуру суспендировали в изотоническом растворе хлорида натрия, устанавливали мутность 1,5 по стандарту McFarland, вносили в колбы на 100 мл с жидкой кукурузно-лактозной средой в соотношении 1:10, инкубировали 48 часов при температуре 31 °С в инкубаторе с содержанием CO<sub>2</sub> в камере 10 – 15%.

### ТП. 2. Культивирование продуцента

Стадия включает в себя подачу тепла, воды, CO<sub>2</sub>; установление рабочих параметров; инокуляцию, культивирование с контролем и корректировкой показателей температуры, pH, pO<sub>2</sub>, перемешивания.

Выращивали культуры *L. paracasei* и *L. acidophilus* методом периодического глубинного культивирования при температуре 37 °С до достижения мутности 9 по стандарту McFarland. Перемешивание и аэрация контролировались программой ферментера автоматически, поддерживая pO<sub>2</sub> ≤ 5%, pH контролировались автоматически, поддерживая диапазон 7,0±0,2.

### ТП. 3. Очистка биомассы

Стадия включает в себя подвод культуральной жидкости к центрифуге, центрифугирование, удаление супернатанта, отмывка осадка водой очищенной, подвод биомассы к дезинтегратору, гомогенизацию, центрифугирование, сбор супернатанта.

Культуральную жидкость отделяли от биомассы продуцента центрифугированием 5 минут с частотой вращения 6000 мин<sup>-1</sup>. Полученную биомассу отмывали от остатков культуральной жидкости, гомогенизировали на УЗ-дезинтеграторе, центрифугировали 15 минут с частотой вращения 15000 мин<sup>-1</sup>, собирали супернатант.

Отходом в данном технологическом процессе является культуральная жидкость и дебрис биомассы.

#### ТП. 4. Экстракция

Стадия включает в себя подвод супернатанта, этанола и аммония сернокислого, установление рабочих параметров, перемешивание, отстаивание, ультрафильтрацию, разбавление водой.

Получение экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ, обладающего ростостимулирующей активностью, представляет собой двухстадийную экстракцию, в которой: первая стадия – одноступенчатая смесительно-отстойная экстракция; вторая – ультрафильтрация. Супернатант соединяли с 96% этанолом в соотношении 50:1 и перемешивали, постепенно вводя кристаллический аммоний сернокислый. При достижении перенасыщения раствора перемешивание останавливали, реакционную смесь переносили в гравитационный отстойник в виде делительной воронки и оставляли до разделения слоев. Отбирали спиртовой слой, отделяли от нерастворимых примесей на установке, состоящей из колбы Бунзена и воронки Бюхнера, где фильтровали через ультрафильтрационные мембраны на основе полисульфонамида «Владипор» под вакуумом – 1 атм. Полученный фильтрат разводили водой очищенной до 30% спирта (v/v).

Отходом в данном технологическом процессе является раствор аммония сернокислого, содержащий неэкстрагированные компоненты культуральной жидкости с микропримесями экстрагента. Аммоний сернокислый подлежит кристаллизации из раствора, очистке и может быть использован повторно. Полученная техническая вода, очищенная дистилляцией пригодна для повторного использования.

#### ТП. 5. Сушка

Стадия включает в себя установление рабочих параметров подвод экстракта, удаление экстрагента, определение массы продукта.

Экстракт инкубировали в конденсоре лиофилизатора при  $-58\pm 2^\circ\text{C}$  до замерзания и понижали давление до  $2,5\times 10^{-3}$  бар. При установлении заданных параметров, отключали охлаждения и естественным путем нагревали до полного удаления экстрагента и разбавителя.

Отходом в данном процессе являются пары воды и спирта, которые подлежат конденсации, очистке и возвращению в технологический процесс.

Выход абсолютного сухого экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ составил 1,7002 г из 1,5 литров питательной среды. Внешний вид – желто-коричневые матовые хлопья.

III. Получение энтеросорбента. Ферментационная установка представляла собой реактор идеального смешения, емкость из бор-силикатного стекла с рабочим объемом 1,5 л, с плоским дном. Для предотвращения образования застойных зон, а также для удобства разгрузки установки допускается использовать емкости с усеченным дном, снабженным сливным устройством.

#### ВР 1. Подготовка оборудования и материалов.

Стадия вспомогательных работ включает в себя санитарную обработку помещений, подготовку оборудования, материалов и воды (ФС.2.2.0020.18 Вода очищенная). Приготовление рабочих растворов, подачу теплоносителя, установление рабочих параметров стерилизацию.

Лигнин гидролизный механически измельчали в порошок, отбирали фракцию с размером частиц  $<180 \mu\text{м}$ . В емкости ферментера готовили 2,5% раствор Na-КМЦ, в котором суспендировали лигнин. В системе контроля pH готовили 1N растворы NaOH и HCl, стерилизовали 10 минут при температуре  $120^\circ\text{C}$ , давлении 1 атм. (0,1 мПа).

#### ТП. 2. Гидролиз

Стадия включает в себя подвод подачу теплоносителей, установление рабочих параметров, подвод фермента, перемешивание, контроль и регуляция температуры и pH.

В полученной суспензии устанавливали pH  $4,5 \pm 0,2$  и вводили раствор целлюлазы, гомогенизировали. Реакционную смесь инкубировали 24 часа при температуре  $55 \pm 5^\circ\text{C}$ , перемешивая с частотой вращения мешалки  $60 \text{ мин}^{-1}$ .

#### ТП. 3. Очистка

Стадия включает в себя подвод реакционной смеси к центрифуге, центрифугирование, декантирование, отмывку осадка.

Реакционную смесь центрифугировали 15 минут с частотой вращения 5000 мин<sup>-1</sup>. Супернатант декантировали, осадок промывали 0,25М боратным буферным раствором, рН 8,5±5, центрифугировали при тех же условиях. Процедуру повторяли трижды, после чего лигнин-сахарную массу направляли в миксер.

IV. Приготовление препарата метабиотика. Емкость для смешивания компонентов представляла собой кювету, снабженную проточным водяным охлаждением.

#### ВР.1. Подготовка оборудования и материалов.

Стадия вспомогательных работ включает в себя санитарную обработку помещений, подготовку оборудования и потребительской упаковки.

Упаковочный материал декотировали методом влажно-тепловой обработки. Раскрой производили по установленной выкройке в соответствии с установленным объемом порошка метабиотика. Края горловины заготовки подгибали на изнаночную сторону и прошивали накладным швом с открытым срезом. Заготовку складывали лицевой стороной внутрь, совмещая боковые края, и прошивали обтачным швом в кант. После выворачивания на лицо, заготовка приобретала вид потребительской упаковки.

#### ТП. 2. Смешивание компонентов

Стадия включает в себя подвод бактериостатической композиции, подвод экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ, подвод энтеросорбента, установление рабочих параметров, смешивание.

В емкости соединяли и равномерно перемешивали до однородной массы:

- энтеросорбент – в количестве 30 частей;
- бактериостатическую композицию – в количестве 1 части, в пересчете на сухую массу экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434;
- сухой экстракт биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ – в количестве 2 частей.

#### ТП. 3. Сушка

Стадия включает в себя подвод массы метабиотика, установление рабочих параметров, сушку.

Сырую массу метабиотика распределяли слоем толщиной до 1 мм на парафинированной бумаге в перфорированных поддонах. Сушили при температуре  $45 \pm 2$  °С до установления влажности 1%.

Отходом на данной стадии является вода, которая удаляется в атмосферу при испарении в процессе сушки.

#### ТП. 4. Измельчение.

Стадия включает в себя подвод сухой массы метабиотика к измельчителю, отбор заданной фракции.

Сухую массу метабиотика измельчали до консистенции крупного порошка и просеивали, отбирали фракцию с размером частиц  $\leq 140$  мкм [100, 110].

Отходом на данной стадии являются фракции порошка метабиотика с размером частиц  $\geq 140$  мкм, которые возвращали на повторное измельчение.

#### ТП. 5. Дозирование и упаковка.

Стадия включает в себя подвод метабиотика к потребительской таре, дозирование, упаковка.

На аналитических весах готовили установленные навески порошка метабиотика [111, 112]. Полученные навески пересыпали в потребительскую тару [114] и прошивали горловину мешка стачным швом.

#### ТП. 6. Стерилизация.

Стадия включает в себя подвод готовой продукции и этиленоксида в газовый стерилизатор, установление рабочих параметров, стерилизацию, выгрузку стерильного продукта.

Метабиотик в потребительской упаковке, загружали в анаэроостат, оборудованный подключением к газу, герметизировали. Камеру вакуумировали, заполняли этиленоксидом и стерилизовали в режиме для портативного аппарата: стерилизующая доза  $1200$  мг/дм<sup>3</sup>, температура не менее  $18$  °С, относительная влажность 80 %, время экспозиции – 16 ч [101]. По завершении стерилизации в камеру подавали атмосферный воздух и выгружали стерильный продукт, готовый к употреблению.



### Характеристика готового продукта

Метабиотик для коррекции микробиоценоза кишечника имеет вид крупного порошка светло-коричневого цвета со специфическим запахом и сладковатым привкусом (рисунок 30).



Рисунок 30 – Внешний вид метабиотика и его товарный вид в потребительской таре на 0,1 кг (изображение демонстрирует вариант упаковки).

### Порядок применения.

Метабиотик для коррекции микробиоценоза кишечника применяется перорально, способом индивидуальной или групповой дачи, при введении в общий рацион с кормами, кормовыми ингредиентами и водой или в качестве компонента при производстве комбикормов, концентратов, премиксов [91].

Применение метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника не исключает использование других лекарственных средств, в том числе ряда антибиотиков. Совместное применение метабиотика и некоторых антибиотиков может увеличивать их эффективность.

Нормы дачи или ввода метабиотика в рацион различным видам животных подбираются индивидуально.

Метабиотик полностью сохраняет активность при однократном цикле замораживания-размораживания.

Препарат не содержит живых, ослабленных или убитых микроорганизмов и/или их структурных компонентов.

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

*Извлечение экстракта из биопродукции.* В делительной воронке соединяли равные объемы препарата, содержащего экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и этилацетата, интенсивно перемешивали и оставляли до разделения смеси. Эфирный слой отбирали, упаривали на ротационном испарителе до полного удаления растворителя, очищали перекристаллизацией при +37°C в системе 96% этанол : вода – 1:1, охлаждали до -20°C. Полученный осадок лиофильно высушивали при давлении  $2,5 \times 10^{-3}$  бар при естественном увеличении температуры от -58°C до +20°C.

*УФ-спектрофотометрия.* Навеску абсолютно сухого экстракта ( $m_{\text{практ}}$ ), извлеченного из биопродукции помещали в мерную колбу на 100 мл растворяли и доводили объем до метки 96% этанолом. 1 мл полученного раствора разводили в мерной колбе на 100 мл, 96% этанолом до указанного объема. Оптическую плотность полученного разведения измеряли на спектрофотометре против 96% этанола, при длине волны 275 нм, в кювете с длиной оптического пути 1 см.

*Определение массовой доли экстракта* выполняли по формуле:  $X = \frac{D_{275} \times K_d \times 100}{m_{\text{практ}} \times l \times A_{1\text{ см}}^{1\%} \times (100 - W)}$ , где:  $D_{275}$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $K_d$  – коэффициент разведения;  $m_{\text{практ}}$  – масса сухого экстракта, г;  $l$  – длина оптического пути, см;  $A_{1\text{ см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения;  $W$  – потери, %. Потери определяли разностью теоретической массы экстракта в исследуемом продукте и массой экстракта, полученной после извлечения из продукта и сушки:  $W_r = m_{\text{теор}} - m_{\text{практ}}$ ; выражают в процентах, в пересчете на теоретическую массу:  $W(\%) = \frac{W_r \times 100}{m_{\text{теор}}}$ .

*Валидационные испытания* [26, 98, 99, 136].

*Линейность* Критерии приемлемости: коэффициент корреляции:  $r_{xy} = \frac{\overline{\overline{x \times y}} - \bar{x} \times \bar{y}}{\sigma_x \times \sigma_y} \geq 0,99$  и коэффициент детерминации:  $R^2 = 1 - \frac{\sigma^2}{\sigma_y^2} \geq 0,99$ . Результаты постановки анализа представлены на рисунке 31.

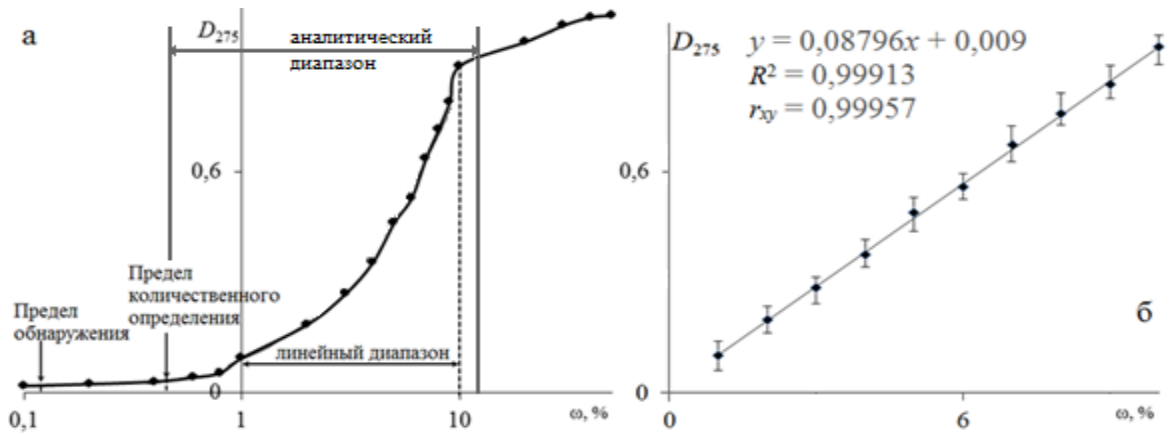


Рисунок 31. Зависимость оптической плотности от массовой доли экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (а – общий график на логарифмической шкале ОХ; б – линейный диапазон)

Коэффициент корреляции составил 0,99957; коэффициент детерминации аппроксимирующей прямой составил 0,99913 – что соответствует критериям приемлемости линейности.

$$\text{Предел обнаружения (LOD)} = 3,3 \times \frac{\sigma_a}{b} \times K_d. 0,147\%.$$

$$\text{Предел количественного определения (LOQ)} = 10 \times \frac{\sigma_a}{b} \times K_d. 0,446\%.$$

*Аналитический диапазон* имеет значения от предела количественного определения до 120% от наивысшей точки (номинала) линейного диапазона: имеет значения от 0,446% до 12%.

*Правильность.* Правильность оценивали при постановке опытов на 3 уровнях концентраций, варьируя  $\pm 5\%$  от основного уровня. Полученное значение использовали для расчета корректирующей дозировки стандартного образца экстракта: +20% для нижнего, +15% для среднего и +10% уровня, соответственно.

Для каждого уровня рассчитывали доверительный интервал:  $r = t \times \sqrt{2 \times S^2_{\text{ср}}}$ ,

$$\text{где } S^2_{\text{ср}} = \frac{\sum \sum s_{ij}^2}{A \times D}; P = 0,95; f = M \times (A - 1) \times D; A = 3; D = 5; M = 3; t(0,95;30) = 2,04.$$

Процент восстановления определяли по формуле:  $R = \frac{\bar{X}_{\text{практ}}}{\bar{X}_{\text{теор}}} \times 100\%$ , где:  $\bar{X}_{\text{практ}}$  – измеренное значение;  $\bar{X}_{\text{теор}}$  – рассчитанное значение Критерий приемлемости: значение  $R$  должно находиться в интервале от 98,0% до 102,0%. Результаты постановки анализа представлены в таблице 34.

Таблица 34. Оценка правильности метода

Параметры	$\omega, \%$								
	Низкий			Средний			Высокий		
Найдено	2,85	2,85	2,85	3,00	3,00	3,00	3,15	3,15	3,15
Добавлено	0,57	0,57	0,57	0,45	0,45	0,45	0,32	0,32	0,32
$\bar{X}_{\text{теор}}$	3,42	3,42	3,42	3,45	3,45	3,45	3,47	3,47	3,47
$\bar{X}_{\text{практ}}$	3,41	3,43	3,43	3,44	3,46	3,46	3,47	3,47	3,48
$S^2_{\text{ср}} \times 10^{-4}$	2,45			2,08			2,6		
$r$	0,045			0,042			0,046		
$\bar{X} \pm r$	3,38 – 3,47			3,41 – 3,5			3,43 – 3,52		
$R, \%$	99,7	100,3	100,3	99,7	100,3	100,3	100,0	100,0	100,3
$\bar{R}, \%$	100,1								

Полученные значения аналитического отклика находятся в пределах доверительного интервала для каждого уровня концентраций. Процент восстановления имеет среднее значение 100,1 %, находится в пределах установленного интервала, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

*Сходимость.* Массовую долю культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 определял один аналитик, который выполнял 6 повторностей за одну постановку при одинаковых условиях.

Критерий приемлемости: коэффициент вариации –  $CV \leq 2\%$ . Результаты постановки анализа представлены в таблице 35.

Таблица 35. Оценка сходимости метода

$X_i$						$\bar{\omega}, \%$	$\sigma \times 10^{-2}$	CV, %
1	2	3	4	5	6			
3,11	3,07	3,09	3,05	2,99	3,14	3,08	5,21	1,69

Коэффициент вариации имеет значение 1,69, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

*Воспроизводимость.* Массовую долю экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 определяли два аналитика. Каждый выполнял по 9 повторностей за одну постановку при одинаковых условиях. Критерии приемлемости: коэффициент вариации –  $CV (\%) \leq 2$ ; критерий Фишера –  $F_{\text{расч}} < F_{\text{табл}}$ . Результаты постановки анализа представлены в таблице 36.

Таблица 36. Оценка воспроизводимости метода

№	$X_i$									$\bar{\omega}$	$\sigma \times 10^{-2}$	CV, %	$S^2 \times 10^{-3}$	$F_p$	$F_T(0,95;8;8)$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9						
1	3,6	3,7	3,6	3,8	3,6	3,6	3,7	3,7	3,6	3,7	6,15	1,68	3,79	1,09	3,44
2	3,6	3,5	3,7	3,6	3,5	3,6	3,7	3,5	3,7	3,6	6,43	1,78	4,13		

Полученные значения коэффициента вариации каждого аналитика не превышают контрольное; расчетный критерий Фишера меньше табличного. Различия между результатами аналитиков статистически незначимы, что позволяет считать воспроизводимость результатов приемлемой.

Таким образом, метод определения массовой доли экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 можно считать пригодным для достоверной оценки состава биопродукции.

#### 4.4 Экспериментальное подтверждение коррекции микробиоценоза кишечника в опыте *in vivo*.

В 2015 году, впервые в мировой истории Российская Федерация опубликовала XIII издание государственной фармакопеи, в котором содержались индивидуальные статьи, и статьи содержащие пункты, посвященные пробиотикам: ОФС.1.7.2.0009.15, ОФС.1.8.1.0002.15, ОФС.1.7.2.0001.15, ОФС.1.2.4.0002.15, ОФС.1.7.2.0012.15 и т.д. На 2024 год большинство пробиотических препаратов не являются лекарственными средствами и не имеют государственного стандарта, регламентирующего их нормы и испытания, кроме приложения 5 «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» Таможенного союза ЕврАзЭС, № 622 от 07.04.2011 г. [95]. Отдельного замечания требует факт описания лишь эубиотиков, синбиотиков и т.д., а также препаратов, содержащих структурные компоненты продуцентов исключительно бактериального происхождения [158]. В частности, метабиотики рассматриваются как производные или компоненты пробиотических микроорганизмов и/или их метаболитов, и/или сигнальных молекул с

определенной (известной) химической структурой, которые способны оптимизировать специфичные для организма-хозяина физиологические функции, регуляторные, метаболические и/или поведенческие реакции, связанные с деятельностью индигенной микробиоты организма-хозяина [159, 165]. Из них: бактериоцины – специфические белки, вырабатываемые некоторыми бактериями и подавляющие жизнедеятельность клеток других штаммов того же вида или родственных видов бактерий [25,50]. Препараты, содержащие метаболиты грибов не имеют фармакопейного описания и методических руководств к исследованиям.

Нами была проведена оценка биологической активности сконструированного метабиотика для коррекции микробиоценоза кишечника в опыте *in vivo*. В эксперименте принимали участие 30 кроликов со средней массой тела 4 кг, которых профилактически дегельминтизировали и выдерживали 7 дней на стандартном лабораторном корме. В нулевой день эксперимента кроликов распределяли в 3 группы по 10 в каждой: I – контроль; II – коммерческий препарат «Симбиолакт»; III – предлагаемый метабиотик. Группе I продолжали давать стандартный лабораторный корм, в количестве 110-120 грамм в сутки на кролика; группам II и III вводили в суточный рацион по 10% препарата «Симбиолакт» и предлагаемого метабиотика, соответственно. В итоге суточная доза препаратов составила 11,5 грамм на кролика, что в пересчете на килограмм массы тела кролика соответствует  $1,44 \times 10^9$  КОЕ *B. animalis ssp. Lactis*,  $1,44 \times 10^9$  КОЕ *L. acidophilus*,  $1,44 \times 10^8$  КОЕ *L. paracasei*,  $1,44 \times 10^8$  КОЕ *L. lactis* из препарата «Симбиолакт» и 0,09 грамм абсолютно сухого экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, 0,18 грамм абсолютно сухого экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ из предлагаемого метабиотика. В 2024 году стоимость 1 грамма препарата «Симбиолакт», произведенного в промышленных условиях, составляет в среднем 58 рублей, цена разовой дозы – 116 рублей; расчетная стоимость 1 грамма предлагаемого метабиотика, произведенного в лабораторных условиях, составляет 130 рублей, цена разовой дозы 14 рублей.

На 3 и 10 день в каждой группе определяли число павших животных; у выживших собирали фекалии, объединяли по группам, гомогенизировали и брали среднюю пробу для оценки состава микробиома [126]. Результаты опыта представлены на рисунке 32.

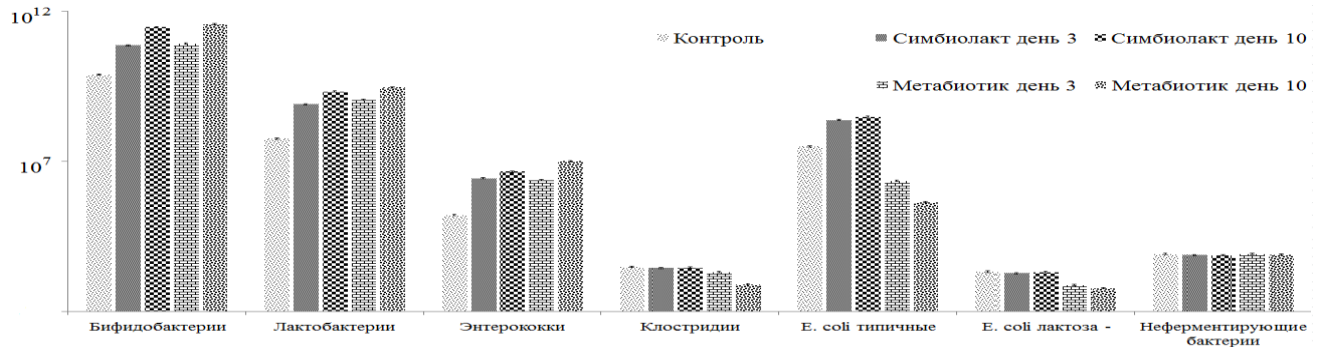


Рисунок 32. Качественный и количественный состав основной микрофлоры толстого кишечника, КОЕ/г фекалий

Группа I. Все кролики живы. Изменения состава микробиома в течение 10 дней не отклонялись больше 20% относительно показателей на старте эксперимента.

Группа II. Все кролики живы. На третий день эксперимента количество бифидобактерий увеличилось в 9,5 раз; лактобактерий –  $\times 13,9$ ; энтерококки –  $\times 16,9$ ; типичные *E. coli* –  $\times 7,4$ . За последующие 7 дней количество бифидобактерий увеличилось в 4 раз, а относительно показателей на старте эксперимента – в 38,2 раз; лактобактерий –  $\times 2,6$  и  $\times 36,7$ ; энтерококки –  $\times 1,7$  и  $\times 28,1$ ; типичные *E. coli* –  $\times 1,3$  и  $\times 9,9$  –соответственно. Количество клостридий, *E. coli* лактоза- и неферментирующих бактерий не отклонялись больше 20% относительно показателей на старте эксперимента.

Группа III. Все кролики живы. На третий день эксперимента количество бифидобактерий увеличилось в 10,7 раз; лактобактерий –  $\times 19,5$ ; энтерококки –  $\times 14,5$ . За последующие 7 дней количество бифидобактерий увеличилось в 4,4 раз, а относительно показателей на старте эксперимента – в 47,5 раз; лактобактерий –  $\times 2,6$  и  $\times 50,7$ ; энтерококки –  $\times 4,4$  и  $\times 63,5$ . Количество клостридий в первые три дня уменьшилось на 33%, за оставшиеся дни уменьшилось еще на 60%, снизив логарифм концентрации на единицу. Количество типичных *E. coli* за три дня



уменьшилось в 14,5 раз; за оставшиеся дни – еще в 5,1 раз; общее снижение -  $\times 73,95$ . Количество *E. coli* лактоза- за три дня уменьшилось в 2,75 раза; за оставшиеся дни – еще в 1,29 раз; общее снижение –  $\times 3,55$ . Количество неферментирующих бактерий не отклонялись больше 20% относительно показателей на старте эксперимента.

В опыте с препаратом «Симбиолакт» отмечается увеличение биомассы микроорганизмов относительно контроля: в 28-38 раз Грам+, и в 10 раз Грам-. Клостридии, *E. coli* лактоза- и неферментирующие оказались индифферентны к препарату. В опыте с предлагаемым метабиотиком отмечается как увеличение, так и уменьшение биомассы микроорганизмов относительно контроля: количество типичных *E. coli* и *E. coli* лактоза – сократилось в 74 и 4 раза соответственно; Грам+ выросли в 47-63, что в среднем в 1,6 раз больше чем в опыте с препаратом «Симбиолакт», однако число клостридий сократилось на 60%. Неферментирующие оказались индифферентны и к предлагаемому метабиотику.

Таким образом, экспериментально подтверждено изменение состава микробиоценоза кишечника кроликов предлагаемым метабиотиком в опыте *in vivo*. В сравнении с препаратом «Симбиолакт» установлена специфичность биологической активности предлагаемого метабиотика в отношении представителей микробиоценоза кишечника. Для кроликов со средней массой тела 4 кг разовая доза предлагаемого метабиотика более чем в 8 раз дешевле, при этом эффективность в 1,6 раз выше, чем у коммерческого препарата.

Это дает основание рекомендовать сконструированный метабиотик для коррекции микробиоценоза кишечника, когда необходимо обеспечить профилактику; ликвидировать или минимизировать последствия расстройств ЖКТ бактериальной этиологии, в том числе диарогенными кишечными палочками, и их осложнения; минимизировать применение антибиотиков; нормализовать микробиоценоз кишечника после антибактериальной терапии.



## ВЫВОДЫ

1. Наибольшее значение коэффициента антибиотической активности 10,91 определено у *T. harzianum* Rifai Б/л 14. Наиболее чувствительным штаммом оказался *E. coli* ATCC 25922 с максимальной зоной угнетения роста - Ø 18,89 ± 0,53 мм и коэффициентом чувствительности 19,06. Штамм *T. harzianum* Rifai Б/л 14 был идентифицирован как *Trichoderma atrobrunneum* и депонирован в Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт - ГосНИИгенетика»), регистрационный номер F-1434. Синтезирует ферменты лейцинариламидазу, β-N-ацетилглюкозаминидазу, γ-глутамилтрансферазу, PNP-N-ацетил-β-D-галактозаминидазу. Оптимальная питательная среда для накопления биомассы – модифицированная CZA («Чапекка»): сахароза – 30; Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> – 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5, KCL – 0,5; FeSO<sub>4</sub> – 0,01; L-аргинин – 1,0; Na-цитрат – 1,0. Оптимальной температурой культивирования является 31°C, pH 7,3.

2. Наибольшие диаметры зон угнетения роста чувствительных культур определяются при совместном инкубировании с БАВ, полученными при трехчасовом экстрагировании этилацетатом из равного объема культуральной жидкости от гетерофазного глубинного культивирования продуцента. *Внешний вид*: абсолютно сухой экстракт имеет вид хлопьев, матовых с вариацией цвета от желто-оранжевого до коричневого. *Температура плавления* = 118±2°C. *Растворимость*: очень легко растворим в 1,2-дихлорэтаноле, ацетоне, ацетонитриле, диметилсульфоксиде, дихлорметане, метаноле, этаноле; легко растворим в бутаноле, изопропаноле, хлороформе; растворим в бензоле, петролейном эфире, тетрахлорметане, толуоле, уксусной кислоте, этилацетате, эфире диэтиловом. *Плотность* ρ<sub>20</sub> = 0,8350 г/см<sup>3</sup>. *Коэффициент преломления* n<sub>D</sub><sup>20</sup> = 1,3602. *Максимум поглощения* λ<sub>max</sub> = 275 нм. *Удельный показатель поглощения* A<sub>1 см</sub><sup>1%</sup> = 625. Экстракт имеет белковую природу; установлено наличие триптофана и аргинина. Проявляет бактериостатический тип активности,

специфичен в отношении Грам- бактерий группы *Enterobacteriaceae*. Максимальное угнетение роста тест-культур достигается при совместном инкубировании с экстрактом культуральной жидкости, полученной при культивировании *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в оптимизированных условиях: сахара – 40,34; Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> – 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2,0; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 1,0; FeSO<sub>4</sub> – 0,001; факторы роста – L-аргинин, Na-цитрат – по 1,0; посевная доза продуцента 2,01 McF; температура 31°C; pO<sub>2</sub> ≥80%; pH 7,3±0,2; продолжительность культивирования 7,78 суток ≈ 187 часов; перемешивание и аэрация на автоматическом регулировании под контролем программы ферментера.

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

Стерилизация. Готовый метабиотик содержит 1 часть бактериостатической композиции, 2 части экстракта биомассы консорциума облигатной микробиоты ЖКТ, 30 частей энтеросорбента. Препарат имеет вид порошка светло-коричневого цвета со специфическим запахом и сладковатым привкусом, размер частиц  $\leq 140 \mu\text{м}$ .

4. Разработан метод определения массовой доли экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в биопродукции. Метод включает 3 этапа: I - Извлечение из биопродукции (экстракция этилацетатом; упаривание; перекристаллизация в системе 96% этанол : вода – 1:1; сушка; стандартизация 96% этанолом). II – УФ-спектрофотометрия (экстинкцию образца измеряли при длине волны 275 нм, в кювете с длиной оптического пути 1 см против 96% этанола). III – Определение массовой по формуле: 
$$X = \frac{D_{275} \times K_d \times 100}{m_{\text{практ}} \times l \times A_{1\text{см}}^{1\%} \times (100 - W)}$$
.

Линейность  $r = 0,99957$ ;  $R^2 = 0,99913$ ; предел обнаружения 0,147%; предел количественного определения 0,446%; аналитический диапазон 0,446% до 12%. Правильность, сходимость и воспроизводимость соответствовали критериям приемлемости, следовательно метод можно считать пригодным для достоверной оценки состава биопродукции.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, Л. А. Фармакотерапевтический справочник ветеринарного врача /Л. А. Абрамова. - Ростов-на-Дону, «Феникс», 2003. - С. 263 -266.
2. Агейченко, А. В. Состояние микробиоценоза толстого кишечника, липидного состава клеточных мембран и антиоксидантного статуса животных при экспериментальном дисбиозе: дис... на соискание ученой степени канд. мед. наук / А. В. Агейченко. - Курск, 2016.
3. Алимова, Ф. К. Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве / Ф. К. Алимова // АГРО XXI. – 2006. – № 4-6. – С. 18-21.
4. Антимикробное действие гриба *Lentinus edodes* на микробиоту человека / О. Ю. Кузнецов, Е. В. Милькова, А. Е. Соснина, Н. Ю. Сотникова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 1. – С. 80–82.
5. Байсханова, Д. М. Биологически активные продукты на основе пробиотических культур и растительных экстрактов / Д. М. Байсханова, Р. Т. Омаров. // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С. 27-34.
6. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Методические рекомендации / утв. Минздравом РСФСР 14 апреля 1977 г.
7. Бактериостатический эффект низкомолекулярных соединений *Trichoderma lixii* (Pat.) / Н. Е. Павловская, И. А. Гнеушева, А. В. Лушников, О. А. Маркина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2019. - Т. 22. - № 2. – С. 3 – 8.
8. Барабой, В. А. Структура, биосинтез меланинов, их биологическая роль и перспективы применения / В. А. Барабой. // Успехи современной биологии. - 2001. - т. 121. - №1.- С. 36-46.
9. Баронец, Н. Г. Витамин К как стимулятор роста микроорганизмов / Н. Г. Баронец. // Микробиология. - 2003. - №4. - С. 104 - 105.
10. Бекбосынова, Б. А. Рациональная терапия дисбактериоза / Б. А.

Бекбосынова. // Здоровье и болезнь. – 2012 – № 6. – С. 24-28.

11. Белов, Л. Г. Холерная вакцина для профилактики диареи у телят / Л. Г. Белов, И. И. Каможный, И. И. Ирьянов. // Ветеринария. - 2002. - №9. - С. 17-18.

12. Биологическое обоснование применения микробных компонентов *Trichoderma* spp. *in vitro* для оздоровления овощных культур закрытого грунта от фитопатогенной инфекции / И. А. Гнеушева, Н. Е. Павловская, И. Ю. Солохина, А. В. Лушников. // АгроЭкоИнфо. – 2019. №3. – [http://agroecoinfo.narod.ru/journal/СТАТУИ/2019/3/st\\_304.doc](http://agroecoinfo.narod.ru/journal/СТАТУИ/2019/3/st_304.doc).

13. Блинкова, Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления / Л. П. Блинкова. // Микробиология. - 2003. - №3.- С. 109 - 113.

14. Бовкун, Г. Ф. Пребиотические добавки, как факторы коррекции микрофлоры кишечника и стимуляторы роста молодняка птиц. / Г. Ф. Бовкун, Ю. В. Овсенко, Е. П. Ващекин. // Вестник. Брянская ГСХА. - 2005. - №2.- С. 61 - 63.

15. Бойцов, А. Г. Дисбиотические нарушения микрофлоры толстого кишечника: проблемы диагностики и коррекции / А. Г. Бойцов, Л. Ю. Нилова, Е. А. Оришак. // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2008. – № 3 (28). – С. 120-123.

16. Бондаренко, В. М. Прикладные аспекты молекулярной биологии бифидобактерий и лактобацилл / В. М. Бондаренко. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 2. – С. 89–97.

17. Бондаренко, В. М. Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека / В. М. Бондаренко. – М., 2007. – С. 9–10.

18. Бондаренко, В. М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией / В. М. Бондаренко, А. А. Воробьев. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 1. – С. 84-92.

19. Бондаренко, В. М. Дисбиотические состояния и лечебные мероприятия при них / В. М. Бондаренко, Р. М. Грачева. // Вестник РАМН. – 2005. – № 12. – С. 23-29.

20. Булатова, Е. Кишечная микробиота: современные представления / Е.

Булатова, Н. Богданова, Е. Лобанова. // Педиатрия. – 2009. – Т.87, №3. – С.104-110.

21. Бухарин, О. В. Изменение активности каталазы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P под влиянием метаболитов микроорганизмов, выделенных из разных экотопов / О. В. Бухарин, А. В. Сгибнев, С. В. Черкасов [и др.] // Микробиология. - 2002. - т. 71. - №2. - С. 183 - 186.

22. Бухарин, О. В. Микрофлора толстой кишки у пациентов с дисплазией соединительной ткани / О. В. Бухарин, О. Е. Челпаненко, А. В. Вальшев [и др.] // Микробиология. - 2003. - №3. - С. 62 - 66.

23. Бухарин, О.В. Характеристика изменений микробиоценоза у больных хроническим неспецифическим уретритом / О. В. Бухарин, Ю. Б. Иванов [и др.] // МЭиИ. - 2001. -№4.- С. 86 - 89.

24. Бухарин, О.В. Межбактериальные взаимодействия / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов, Л. М. Хусиутдинова. // МЭиИ. - 2003. - №4 - С. 3 - 8.

25. Бактериоциногенез / Лиходед В. Г. // Большая медицинская энциклопедия: в 30 т. / гл. ред. Б. В. Петровский. — 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1975. — Т. 2: Антибиотики — Беккерель. — 608 с.: ил.

26. Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представление результатов: Методические указания. - М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. - 39 с.

27. Вахитов, Т.Я. Сравнительное изучение действия экзометаболитов *Escherichia coli* М - 17 и фруктоолигосахаридов на рост и антагонистическую активность лактобацилл / Т. Я. Вахитов, О. В. Добролеж, Л. Н. Петров [и др.] // Микробиология. - 2001. - №3. - С. 80-83.

28. Вегнер, К.Э. Случай генерализованного кандидоза / К. Э. Вегнер, Э. И. Белобородова, В. Сиянов В [и др.] // Клиническая медицина. - 2003. - №7. - С. 63 - 64.

29. Вешняков, В. А. 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.

30. Воеводин, Д.А. Патогенетическая роль кишечного микробиоценоза в кишечнике наследственных миодистрофий / Д. А. Воеводин, В. Ф. Ситников, М. А. Стешена [и др.] // Микробиология. - 2001. - №5. - С. 68 - 70.

31. Воробьев, А. А. Сравнительное изучение микрофлоры толстой кишки в эксперименте на мышах / А. А. Воробьев, Ю. В. Несвижский, А. Е. Зуденков [и др.] // Микробиология. - 2001. - №1. - С. 62 - 67.

32. Воробьев, А. А. Исследование пристеночной микрофлоры кишечника человека / А. А. Воробье, Ю. В. Несвижский, Е. М. Лепницкий [и др.] // Микробиология. - 2003. - №1.- С. 60-63.

33. Воробьев, А. А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта у человека в норме и при патологии / А. А. Воробьев, Ю. В. Несвижский, Е. М. Липницкий [и др.] // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2004. - № 2. – С. 43 - 47.

34. Воронина, О. А. Эксперимент при конструировании и технологии электронных средств: планирование, проведение, анализ: учеб. пособие / О. А. Воронина, В. А. Лобанова. – Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2019. – 282 с.

35. Вторичные метаболиты [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://refdb.ru/look/2407807.html> / (дата обращения: 18. 04.2018)

36. Габдрахманова, Л. А. Оптимизация среды культивирования для продукции глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedins* 3-19. / Л. А. Габдрахманова, Н. П. Банабан [и др.] // Микробиология. - 2002. - т. 71. - №3. - С. 323 - 329.

37. Гайсина, Ю. Р. Эндотоксинемия и влияние микробных липополисахаридов на систему гемостаза у женщин с бактериальным вагинозом / Ю. Р. Гайсина, Ю. А. Ахмадуллина, А. Ж. Гильманов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. - Т.6. - № 3. – С. 155-159.

38. Гнеушева, И.А. Чувствительность к антимикотикам микромицетов *Trichoderma spp.*, перспективных продуцентов биологически активных

соединений / И. А. Гнеушева, А. В. Лушников. // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. – 2018. – № 4. – С. 46 – 51.

39. Гнеушева, И. А. Антимикробная активность ветеринарных бактериостатических композиций на основе *Trichoderma harzianum Rifai* / И. А. Гнеушева, А. В. Лушников, Н. Е. Павловская. // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. – 2018. – № 9. – С.65-74.

40. Гнеушева, И. А. Антибактериальные эффекты БАВ различного происхождения и их сочетанного действия с некоторыми  $\beta$ -лактамами антибиотиками /И. А. Гнеушева, Н. Е. Павловская, А. В. Лушников. // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2018. – № 10. – С. 87 – 91.

41. Гнеушева, И. А. Биологические эффекты гречихи посевной / И. А. Гнеушева, И. Ю. Солохина, А. В. Лушников. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. Т. 25, № 6. – С. 28 – 39.

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

43. Гнеушева, И. А. Подбор оптимального состава питательной среды и условий глубинного культивирования микробного продуцента бактериостатических соединений / И. А. Гнеушева, А. В. Лушников. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2023. – Т. 15. – № 1. – С. 13–24.

44. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. / Н.Б. Гнеушева, Е.С. Бабусенко. - М., 2001. - 82 с.

45. Гриневич, В. Б. Коррекция дисбиоза кишечника — фактор преодоления инсулинорезистентности / В. Б. Гриневич. // Клиническое питание. – 2007. - № 1 - 2. - С. 35.

46. Гриневич, В. Б. Современные представления о значении кишечного



микробиоценоза человека и способы коррекции его нарушений / В. Б. Гриневич, М. М. Захарченко. // Новые СПб врачебные ведомости. – 2003.- № 2. - С. 13 - 20.

47. Гриценко, В. А. Свойства эшерихий, выделенных из организма мышей при бактериальной транслокации после иммобилизационного стресса. / В. А. Гриценко, Ю. А. Брудастов, О. С. Журлов [и др.] // Микробиология. - 2000.- №2. - С. 37-41.

48. Дисбактериоз кишечника: рук. по диагностике и лечению: под ред. Е. И. Ткаченко, А. Н. Суворова. – СПб.: Спецлит, 2007. – 238 с.

49. Дрегваль, О. А. Влияние состава питательной среды на рост и развитие энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis*. /О.А. Дрегваль, Н. В. Черевач, А. И. Винников. // Микробиологический журнал. - 2002. - т. 64. - №2. - С. 44-45.

50. Егоров, Н. С., Баранова И. П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение (1999) : антибиотики и химиотерапия, № 6, стр. 33-40.

51. Ефимов, Б. А. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища. /Б. А. Ефимов, Д. И. Кафарская, В. М. Коршунов. // Микробиология. - 2005. - №4. - С. 72 - 78.

52. Завгородняя, Е. Ф. Дисбактериоз кишечника (обзор) / Е. Ф. Завгородняя. // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2010. - №16. – С.131-141.

53. Завгородняя, Е. Ф. Особенности микробиологической характеристики дисбиозов кишечника в современных условиях / Е. Ф. Завгородняя. // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2008. – № 12. – С. 161-162.

54. Заквасочные культуры лактобацилл – продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот / А. В. Олескин, О. Г. Жиленкова, Б. А. Шендеров. // Молочная промышленность. – 2014. – № 9. – С. 42–43.

55. Затевалов, А.М. Интегральная оценка состояния микробиоценозов биотопов желудочно-кишечного тракта и методы коррекции их нарушений: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / А. М. Затевалов. - Москва, 2016.

56. Знаменская, Л. В. Биосинтез новых высокомолекулярных секретлируемых рибонуклеаз у *Bacillus intermedius* и *Bacillus subtilis*. / Л. В. Знаменская, М. А. Харитоновна [и др.] // Микробиология. - 2002. - т. 71. - №6. - С. 801 - 808.
57. Ильин, В. К. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания / В. К. Ильин, А. И. Воложин, Г. В. Виха. – М: Наука, 2005. – 273 с.
58. Использование грибов рода *Trichoderma* Режим доступа: <http://bibliofond.ru/view.aspx?id=698120> / (дата обращения: 12.03.2018).
59. Калмыкова, А. И. Пробиотики: теория и профилактика заболеваний. Укрепление здоровья. /А. И. Калмыкова. - Новосибирск, 2001. .- 203 с.
60. Кафарская, Л.И. Микробная экология влагалища. / Л. И. Кафарская, О. В. Коршунова, Б. А. Ефимов [и др.] // Микробиология. - 2002.- №6. - С. 91 - 99.
61. Каширская, Н. Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры / Н. Ю. Каширская. // РМЖ. – 2008. – № 4. – С. 64-66.
62. Кириленко, М. А. Оценка свойств пробиотических и аутопробиотических штаммов лактобацилл разными методами: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. / М. А. Кириленко. – Иваново, 2022.
63. Кириллов, Д.А. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на биологические свойства микроорганизмов. / Д. А. Кирилов, И. Н. Чайникова, Н. Б. Перунова [и др.] // Микробиология. - 2003. - №4. - С. 74 - 78.
64. Кленова, И. Ф. Справочник. Ветеринарные препараты в России. /И. Ф. Кленова, Н. А. Яременко. - Москва, «Сельхозиздат», 2000. - С. 432.
65. Климентова, Е. Г. Антагонистическая активность гемолитических *Escherichia coli*, выделенных из толстой кишки мышей с экспериментальным дисбактериозом, обусловленным действием  $\delta$ -эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* / Е. Г. Климентова. // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2012. – № 3. – С. 13-19.
66. Кожевников, А. А. Кишечная микробиота: современные

представления о видовом составе, функциях и методах исследования / А. А. Кожевников, К. В. Раскина, Е. Ю. Мартынова [и др.] // РМЖ. – 2017. – № 17. – С. 1244–1247.

67. Коршунов, В. М. Качественный состав нормальной микрофлоры кишечника у лиц различных возрастных групп. / В. М. Коршунов, Л. В. Потоликин, В. А. Ефимов В.А. [и др.] // Микробиология. - 2001. - №2.- С. 57 - 62.

68. Костюкевич, О. И. Современное представление о микробиоценозе кишечника. Дисбактериоз и его коррекция / О. И. Костюкевич. // РМЖ. – 2007. – № 28. – С. 2176-2182.

69. Куварина, А. Е. Нерибосомальные пептиды грибов: биологическая активность и их перспективы в медицине / А. Е. Куварина, А. В. Кураков, В. С. Садыкова, Т. И. Громовых. // Проблемы медицинской микологии. - 2016. - Т. 18. - № 3. - С. 36-41

70. Кузин, А.И. Пробиотик спорметрии для профилактики и лечения при эндометрите коров. / А. И. Кузин, Г. В. Борисова, Д. В. Губанов. // Ветеринария. - 2002. - № 11.- С. 28-29.

71. Кузнецова, А. В. Использование предстартерного комбикорма «Витастарт» и пробиотических препаратов в кормлении цыплят - бройлеров. Автореф. дисс. на соиск. уч. степ. канд. с/х наук. / А. В. Кузнецова. - М., 2005. - С. 13-16.

72. Кучумова, С. Ю. Физиологическое значение кишечной микрофлоры / С. Ю. Кучумова, Е. А. Полуэктова, А. А. Шептулин [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии — 2011. — Т. 21, № 5. — С.17–27.

73. Кушугулова, А. Р. Актуальные вопросы исследований и производства пробиотической продукции / А. Р. Кушугулова. // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. – № 2. – С. 25-31.

74. Лашевский, В. В. Поиск эндонуклеаз рестрикции, обнаруживающих гетерогенность 16Sр РНК некоторых видов молочнокислых бактерий. / В. В. Лашевский, Н. К. Коваленко. // Микробиология. - 2002. - т. 64 - №2. - С. 21 - 27.

75. Леванова, Л. А. Становление микрофлоры кишечника у детей первого года жизни. / Л. А. Леванова, В. А. Алешкин [и др.] // МЭиИ. - 2001. - №34.- С. 47 - 49.
76. Леванова, Л. А. Микробиоценоз кишечника в критические периоды развития ребенка. / Л. А. Леванова, В. А. Алешкин, А. А. Воробьев [и др.] // Микробиология. - 2002.- №36.- С. 69- 73.
77. Лоранская, И. Д. Функциональный анализ микробиоценоза кишечного тракта/ И. Д. Лоранская, О. А. Лаврентьева. // РМЖ. – 2011. - №17. – С.1057.
78. Лушников, А. В. Кинетические характеристики расщепления сахарозы в экстракте биомассы *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 / А. В. Лушников, И. А. Гнеушева, И. Ю. Солохина. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2020. Т. 16, № 3. – С. 31 – 35.
79. Мазанкова, Л. Н. Бифиформ: новые аспекты применения при ОРВИ у детей / Л. Н. Мазанкова, Л. А. Павлова, Т. А. Чеботарева. // Фарматека. – 2005. – № 1. – С. 69-71.
80. Мазанкова, Л. Н. Оценка состояния кишечной микрофлоры при острых кишечных инфекциях у детей младшего возраста / Л. Н. Мазанкова, Н. О. Ильина, О. А. Кондракова, А. М. Затевалов. // Детские инфекции. - 2005.- Т. 4. - № 3. - С.11 - 15.
81. Максименко, Л. Л. Современные тенденции формирования заболеваемости взрослого населения. / Л. Л. Максименко. // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. - 2002. -№6. - С. 3 - 5.
82. Максимова, Т.М. Здоровье населения и социально - экономические проблемы общества. / Т. М. Максимова, О. Н. Гаенко. // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. - 2003. - №1.- С. 3 - 7.
83. Малиский, А. Н. Способ оценки прочности адгезии *Candida albicans* на эпителиоцитах. / А. Н. Малиский, Е. В. Салина [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. - 2003. - №2. - С. 53 - 54.
84. Маркина, О.А. Математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atrobrunneum* на питательной среде с различными углеводными

компонентами / И. А. Гнеушева, А. В. Лушников, Н. Е. Павловская, О. А. Маркина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2018. Т. 14, № 3. – С. 13 – 18.

85. Микроэкологические изменения в кишечнике при дисбактериозе: экспериментальное обоснование возможности коррекции дисбиотических изменений пребиотиком стимбифид / В.Н. Бредихин [и др.] // Кишечная микрофлора: взгляд изнутри: инновац. сб. науч. ст. – 2013. – № 2. – С. 102-103.

86. Микроэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками / А.А. Воробьев [и др.] // Вестник РАМН. – 2004. – № 2. – С. 13-17.

87. Моргунова, В. И. Профилактика колибактериоза у новорожденных телят. / В. И. Моргунова, И. М. Актухов, В. И. Моргунов [и др.] // Ветеринария. - 2003. - №1.- С. 18-21.

88. Мубаракшина, О. А. Нарушения микробиоценоза кишечника и их коррекция / О. А. Мубаракшина, З. Р. Щербова. // Медицинский вестник. – 2008. – № 33, 24 окт. – С. 18.

89. Николаев, Ю. А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю. А. Николаев, В. К. Плакунов. // Микробиология. – 2007. – № 76(2). – С. 149–163

90. Новик, Г. И. Характеристика полисахаридов, секретируемых *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ. / Г. И Новик, Н. И. Астапович, И. Кюблер [и др.] // Микробиология. - 2002.- т. 71.- №2.- С. 205 - 210.

91. Обоснование применения энтеросорбентов на базе недревесного растительного сырья в ветеринарной практике / И. А. Гнеушева, И. Ю. Солохина, А. В. Лушников, Н. Ю. Агеева // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2022. Т. 18, № 3. – С. 14 – 19.

92. Определение оптимальной среды и условий глубинного культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 / И. А. Гнеушева, А. В. Лушников, Н. Е. Павловская, О. А. Маркина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени

Ю.А. Овчинникова. – 2019. Т. 15, № 1. – С. 10 – 16.

93. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. — М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. - 91 с.

94. Осипова, И. Г. Споровые пробиотики. / И. Г. Осипова, Н. А. Михайлова [и др.] // Микробиология. - 2002.- №3.- С. 113 - 119.

95. Осипова, И.Г., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С., Саканян Е.И. Общие фармакопейные статьи на препараты пробиотики для государственной фармакопеи РФ XIII издания – первый опыт в мировой фармакопейной практике // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 6-2. – С. 272-276

96. Особенности микробиоценоза толстой кишки при дисбиотических нарушениях / И. В. Вальшева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 1. – С. 67-70.

97. ОФС 1.1.0007.18 «Стандартные образцы» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

98. ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

99. ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

100. ОФС 1.1.0015.15 «Ситовой анализ» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

101. ОФС 1.1.0016.18 «Стерилизация» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

102. ОФС 1.2.1.0005.15 «Растворимость» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

103. ОФС 1.2.1.0011.18 «Температура плавления» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

104. ОФС 1.2.1.0014.15 «Плотность» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

105. ОФС 1.2.1.0017.15 «Рефрактометрия» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

106. ОФС 1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

107. ОФС 1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

108. ОФС 1.2.2.0001.15 «Общие реакции на подлинность» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I).

109. ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II).

110. ОФС 1.4.1.0010.15 «Порошки» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II).

111. ОФС 1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II).

112. ОФС 1.4.2.0009.18 «Однородность массы дозированных лекарственных форм» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II).

113. ОФС 1.7.2.0001.15 «Безопасность пробиотиков в тестах in-vivo» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II).

114. ОФС 1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические лекарственные препараты» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II).

115. Пальцев, А. И. О питании и здоровье / А. И. Пальцев. - Новосибирск, 2004. - С. 94 - 102.

116. Патент РФ 2710783. Штамм *Trichoderma atrobrunneum*, обладающих антибактериальной активностью в отношении возбудителя сибирской язвы. / Н. Е. Павловская, И. А. Гнеушева, А. В. Лушников, О. А. Маркина; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина". Номер заявки: 2019102438. Дата публикации: 13.01.2020.

117. Патент РФ 279723. Линимент ранозаживляющий, содержащий бактериостатические метаболиты *T. atrobrunneum* F-1434 и сумму биофлавоноидов гречихи. / Н. Е. Павловская, И. А. Гнеушева, А. В. Лушников; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина". Номер заявки: 2019121127. Дата публикации: 22.04.2020.

118. Парфенов, А. И. Микробная флора кишечника и дисбактериоз / А. И. Парфенов. // РМЖ. - 2007. – № 2. – С. 58-63.

119. Парфенов, А. И. Синдром раздраженного кишечника / А. И. Парфенов; под общ. ред. Л. Б. Лазебника. - Текст: непосредственный // Избранные



главы клинической гастроэнтерологии. – М.: Анахарсис, 2005. – С. 272-276.

120. Патент RU2680268C1. Система детекции наиболее значимых прокариотических представителей микробиоты кишечника человека на основе ПЦР панели / А. С. Попенко, А. В. Тяхт, Д. Г. Алексеев [и др.]; заявитель и патентообладатель: общество с ограниченной ответственностью «Кномикс»; заявл. 20.10.2017; опубл.: 19.02.2019, Бюл. № 5. – 106 с.

121. Подгорский, В. С. Лектиновая активность противоопухолевых веществ, синтезируемых *Vacillus subtilis* В-7025. / В. С. Подгорский, Э. А. Коваленко [и др.] // Микробиология. - 2002. - т. 64.- № 5. - С. 10 - 16.

122. Полуэктова, Е. А. Современные методы изучения микрофлоры желудочно-кишечного тракта / Е. А. Полуэктова, О. С. Ляшенко, О. С. Шифрин [и др.] // РЖГГК. – 2014. – Т.24. - №2. – С.85-91.

123. Приказ МЗ РФ от 9 июня 2003 г. № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Москва, 2003.

124. Прикладная статистика. Классификация и снижение размерности / С.А. Айвазян, В. М. Бухштабер, И. С. Енюков, Л. Д. Мешалкин. - М.: Финансы и статистика, 1989. - 607 с.

125. Пробиотики в комплексном лечении больных с заболеваниями ЖКТ с сопутствующим дисбактериозом кишечника / Н. М. Грачева, О. С. Партин, О. С. Аваков. // Лечащий врач. – 2008. – № 9. – С. 78–79.

126. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: ОСТ 91500.11.0004-2003. – введ. Приказом МЗ РФ № 231 от 9.06 2003. – М., 2003. – 173 с.

127. Пузырь, А. П. Особенности строения колоний *Vacillus subtilis* 2335. / А. П. Пузырь, О. А. Могильная, Т. Ю. Крылова. // Микробиология. - 2002.- т. 71.- №1. - С. 66 - 74.

128. Румянцев, А. Г. Дисбактериоз как индикатор здоровья и показание к терапии у детей: национальный миф и научная реальность / А. Г. Румянцев. // Детская больница. – 2000. – № 1. – С. 75–77.

129. Садовая, Н. Д. Течение первой половины беременности у женщин с

дисбактериозом кишечника, профилактика осложнений: дис. на соискание учёной степени канд. мед. наук. / Н. Д. Садовая. - Санкт-Петербург, 2022.

130. Сирокваша, Е. А. Изучение влияния субалина на урогенитальную микрофлору беременных женщин. / Е. А. Сирокваша, С. И. Паранько, С. Н. Козицкая [и др.] // Микробиология. - 2002.- т. 64.- №1.- С. 27 - 29.

131. Ситкин, С. И. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника / С. И. Ситкин, Е. И. Ткаченко, Т. Я. Вахитов. // Альманах клинической медицины. – 2015. - №40. – С. 12-34.

132. Смирнов, В. В. Бактерии рода *Bacillus* - перспективный источник биологически активных веществ. / В. В. Смирнов, И. Б. Сорокулова, И. В. Пинчук. // Микробиология. - 2001. - т. 63. - №1. - С. 72 - 76.

133. Соколова, И. А. Использование ромакола в ветеринарии. / И. А. Соколова, И. А. Хмель, Э. А. Шегидевич. // Ветеринария. - 2001. - №11.- С. 46 - 48.

134. Тимченко, Л. В. Влияние нового биологически активного препарата «Эмбриоприм» на микробиоценоз кишечника собак при экспериментальном дисбактериозе / Л. В. Тимченко, Н. И. Гандрабурова. // Живые и биокосные системы [Электронный ресурс]: науч. электрон. период. изд. – 2012. – № 1. – Режим доступа: <http://jbks.ru/archive/issue-1/article-5>.

135. Тренин, А. С. Методология поиска новых антибиотиков: состояние и перспективы / А. С. Тренин. // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 7. - № 8. – С. 43 - 46.

136. Третьякова, О. С. Отечественная система государственного контроля качества лекарственных средств и изделий медицинского назначения на современном этапе /О. С. Третьякова, И. В. Заднипряный. // ТМБВ. - 2021. - №4. – С. 34-41.

137. Украинцев, С. Е. Олигосахариды грудного молока и пребиотики в питании грудных детей. /С. Е. Украинцев, Е. Ф. Лукушина, Т. С. Лазарева. // Педиатрия. - 2007; - 86 (6). - С. 75–80.

138. Уразаев, Д. Н. Биологическая роль железа. Применение

железосодержащих препаратов в ветеринарной медицине: монография. / Д. Н. Уразаев, А. А. Дельцов, Л. П. Парасюк, Р. Д. Уразаева. – М.: Колос, 2010. – 104 с.

139. Урсова, Н. И. Нарушение микрофлоры и дисфункция билиарного тракта у детей. Руководство для практикующих врачей. / Н. И. Урсова; под ред. Римарчук Г.В. - М.: Прототип; 2005. - 224 с.

140. Урсова, Н.И. Особенности формирования микробиоценоза у грудных детей и дисбактериоз кишечника / Н. И. Урсова. // Consilium medicum. Педиатрия. – 2005. – № 2. – С. 56-59.

141. Усачев, И. И. Микробиоценоз кишечника, его оценка и контроль у овец, целенаправленное формирование у новорожденных ягнят: дис. на соискание ученой степени докт. вет. наук. /И. И. Усачев. – Брянск, 2014.

142. Устинова, Г. И. Применение гликопина для повышения антиинфекционной резистентности животных и усиление иммуногенной активности вакцинных препаратов / Г. И. Устинова., Т. М. Андропова, О. Д. Кучерук [и др.] // Методические рекомендации. – Утв. отд. вет. медицины РАСХН. 28.12.2005.-18 с.

143. Ушкалова, Е. А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии / Е. А. Ушкалова. // Фарматек. - 2007. – № 6. – С. 16–23.

144. Федосенко, С.В. Анализ таксономического состава кишечной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких / С. В. Федосенко, Л. М. Огородова, В. М. Говорун [и др.] // Уральский медицинский журнал. - 2014. – № 6. – С.168–173.

145. Феклисова, Л. В. Применение лактозосодержащих пробиотиков: оценка многолетнего использования Аципола в педиатрической практике / Л. В. Феклисова // Педиатрия. – 2007. – № 2 – С. 31–35.

146. Хавкин, А. И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / А. И. Хавкин // РМЖ. – 2003. – Т. 11, № 3. – С. 122–126.

147. Хавкин, А. И. Нарушение микроэкологии кишечника и энтеросорбция / А. И. Хавкин // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 78-80.

148. Хромова, С. С. Иммунорегуляция в системе микрофлора -

интестинальный тракт. / С. С. Хромова, Б. А. Ефимов, Н. П. Тарабрина [и др.] // Аллергология и иммунология. - 2004. - т. 5. - № 2. - С. 265-271.

149. Циммерман, Я. С. О сущности понятия «дисбактериоз (дисбиоз) кишечника» и правомерности использования этого термина. /Я. С. Циммерман. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2000. - №1.- С. 81-84.

150. Циммерман, Я. С. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника и/или «синдром избыточного бактериального роста» / Я. С. Циммерман // Клиническая медицина – 2005. – № 4. – С. 14-22.

151. Циммерман, Я. С. Эубиоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: мифы и реалии/ Я. С. Циммерман // Клиническая медицина. – 2013. – Т.91, №1. – С. 4-11

152. Черкасов, С. В. Изменение биологических свойств *Staphylococcus epidermicus* и *Escherichia coli* под влиянием метаболитов вагинальных лактобацилл в эксперименте / С. В. Черкасов, Т. М. Забирова, А. В. Сгибнев [и др.] // Микробиология. - 2001.- №4.- С. 114 - 116.

153. Чернин, В.В. Симбионтное пищеварение человека. Физиология. Клиника, диагностика и лечение его нарушений. / А. И. Парфенов, В. М. Бондаренко, О. В. Рыбальченко, В. М. Червинец. - 2-е изд., перераб. и доп. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2013. – С. 125 – 200.

154. Шапиро, Д.К. Практикум по биологической химии. / Д. К. Шапиро; под ред. академика АН БССР А. С. Вечера. - Изд. 2-е перераб. и доп. - Минск, "Вышэйшая школа", 1976. - 288 с., ил.

155. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание /Б. А. Шендеров. - М., 2001. - т. III. - С. 287.

156. Шендеров, Б. А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья / Б. А. Шендеров // Метаморфозы. – 2014. – № 5. – С. 72–80.

157. Шендеров, Б. А. Функциональное питание, криогенные банки микробиоценозов и их роль в сохранении и восстановлении здоровья / Б. А.

Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2003. – № 1. – С. 29–31.

158. Шендеров, Б.А., Сеница А.В., Захарченко М.М. Метабиотики: вчера, сегодня, завтра. — СПб.: Крафт, 2017. — 80 с.

159. Шендеров, Б.А., Ткаченко Е.И., Лазебник Л.Б., Ардатская М.Д., Сеница А.В., Захарченко М.М. Метабиотики – новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микробиологическими нарушениями в организме человека // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2018. — № 3 (151).

160. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология: некоторые итоги и перспективы исследований / Б. А. Шендеров // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2005. - № 12. – С.13-17.

161. Шульпекова, Ю.О. Применение пробиотиков в клинической практике / Ю. О. Шульпекова // РМЖ. – 2003. – № 8. – С. 16-22.

162. Юдин, С.М. Анализ микробиоты человека. Российский и зарубежный опыт / С. М. Юдин, А. М. Егорова, В. В. Макаров // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2018. - №11. – С. 175-180.

163. Яковенко, Э. П. Дисбактериоз кишечника / Э. П. Яковенко // Лечебное дело. – 2004. – № 3. – С. 3-8.

164. Abid A., Vacha N., Ahmad B., et al. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites //Asian Pac. J. Trop. Biomed. – 2014. – Vol. 4, №11. – P. 859-870

165. Ардатская М.Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции // Трудный пациент. — 2017. — № 6-7.

166. Backhed, F. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. / M. Breitbart, I. Hewson, B. Felts, J.M. Mahaffy, J. Nulton, P. Salamon, F. Rohwer // J. Bacteriol. – 2003. - 185(20): - P. 6220 - 3.

167. Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C. and Codon A.C., Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains, Int. Microbiol., 2004; 7: 249-260.

168. Bingham, S.A. Dietary fibre in food and protection against colorectal

cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* / S.A. Bingham, - 2003. - 361(9368). - P. 1496 - 501.

169. Box G. E. P., Wilson K. B. On the experimental attainment of optimum conditions//*J. Roy. Stat.Soc, ser.B.13.1951, N1*

170. Brakhage A. Regulation of fungal secondary metabolism //*Nature Rev. Microbiology*. – 2012. – P. 1-12

171. Breitbart M., Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing / M Breitbart, F. Rohwer // *J. Bacteriol*. – 2003. - 185(20). – P. 6220 - 6223.

172. Brüggemann, H. Bacteriophages infecting *Propionibacterium acnes* / H. Brüggemann, R. Lood // *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* Vol. - 2013, - Article ID 705741, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/705741>.

173. Cani, P. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. / P. Cani, J. Amar // *Diabetes* – 2007 - № 56, P. 1761-1772.

174. Chen, C. C. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states / C. C. Chen, W. A. Walker // *Adv. Pediatr*. – 2005. – Vol. 52. – P. 77–113.

175. Chet I. *Trichoderma*: Application, Mode of Action and Potential as Biocontrol Agent of Soilborne Plant Pathogenic Fungi; in Chet I., ed., *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, John Wiley & Sons, New York, 1987; 137-160.

176. Comito, D. Dysbiosis in the pathogenesis of pediatric inflammatory bowel diseases / D. Comito, C. Romano. // *Int. J. Inflammation*. – 2012. – Vol. 7. – P. 1-7.

177. Corthesy, B. Cross-Talk between probiotic bacteria and the host immune system / B. Corthesy, H. R. Gaskins, A. Marcenier // *J. Nutr*. – 2007. – Vol. 137. – P. 781–790.

178. Crusell, M.K.W. Gestational diabetes is associated with change in the gut microbiota composition in third trimester of pregnancy and postpartum / M.K.W. Crusell [et al.] // *Microbiome*. – 2018. – Vol. 6, №1. – P.89.

179. Cui, X. Metagenomic and metabolomic analyses unveil dysbiosis of gut microbiota in chronic heart failure patients. / X. Cui [et al.] // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8,

№1. – P.635.

180. Comito, D. Dysbiosis in the pathogenesis of pediatric inflammatory bowel diseases / D. Comito, C. Romano. // *Int. J. Inflammation*. – 2012. – Vol. 7. – P. 1-7.

181. Daniel J.F. and Filho E.R. Peptaibols of *Trichoderma* // *Natural Product Reports*. – 2007. – Vol. 24. – P. 1128-1141.

182. Delzenne, N.M. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. / N.M. Delzenne // *Br J Nutr*, - 2005. - 93 Suppl 1 - p. S157 - 61.

183. 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. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 749–759.

184. Dubinkina, V.B. Metagenomic Analysis of Taxonomic and Functional Changes in Gut Microbiota of Patients with the Alcohol Dependence Syndrome / V.B. Dubinkina [et al.] // *Biomedical Chemistry*. – 2016. – Vol.10, № 2. – P.184–190.  
Садовая 140

185. 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

186. Dudler, R. Interactions between bacteria and eukaryotes via small molecules / R. Dudler, L. Ebert // *Curr Opin Biotechnol*. – 2006. – Vol. 17. – P. 268–273

187. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism / Vujkovic-Cvijin I. [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2013. – Vol. 10, N 5(193). – P. 1-28.

188. 134 Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications / J.G. LeBlanc [et al.] // *World. J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20, N 44. – P. 16518-16528.

189. Einerhand, A.W. Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models. / A.W. Einerhand // *Eur J Gastroenterol Hepatol* - 2002. - № 14(7) - P. 757 - 65.

190. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections / N. Noiby, T. Bjarnsholt, C. Moser [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2015. – Vol. 21, № 1. – P. 1–25.
191. Gupta V.G. Biotechnology and biology of Trichoderma. // V.G. Gupta, M. Shmoll, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. Tuohy – Newnes, 2014/ 1372 p.
192. Far from the Eyes, Close to the Heart: Dysbiosis of Gut Microbiota and Cardiovascular Consequences / M. Serino [et al.] // *Curr. Cardiol. Rep.* – 2014. – Vol. 16. – P. 540-547.
193. Floch, M.H. Recommendations for probiotic Use in humans – A / M.H. Floch // *Pharmaceuticals*. – 2014. – Vol.7, N 10. – P. 999-1007.
194. Fox, E.M. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology [Text] / E.M.Fox, B.J.Howlett // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 11. – P. 481–487.
195. Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? / R. M. Stilling, S. R. Bordenstein, T. G. Dinan, J. F. Cryan // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2014 – Vol. 4. – P. 147
196. Genetic dysbiosis: the role of microbial insults in chronic inflammatory diseases / L. Nibali1 [et al.] // *J. Oral Microbiol.* – 2014. – Vol. 6. – P. 1-10.
197. Gevers, D. The human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome / D. Gevers [et al.] // *PLoS Biol.* – 2012. – Vol. 10, №8. - P.1001-1377.
198. Goel, A. Gut microbiota and liver disease / A. Goel, M. Gupta, R. Aggarwal // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2014. – Vol. 29, N 6. – P. 1139-1148.
199. Gomes, A.C. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity / A.C. Gomes, C. Hoffmann, J.F. Mota // *Gut Microbes*. – 2018. – Vol. 9, №4. – P.308-325.
200. Gut microbiota in health and disease / I Sekirov., S. L. Russell, L. C. Antunes, B. B. Finlay // *Physiol. Rev.* – 2010. – Vol. 90(3). – P. 859–904.
201. Hallert, C. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet:



Controlled pilot study. / Hallert, C. // *Inflammatory Bowel Diseases*. - 2003. - № 9(2). - P. 116 – 121.

202. Harman G.E., Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. // *Phytopathology*. – 2006. - 96. – P.190-194. DOI 10.1016/S0065-2164(04)56010-0.

203. Hamer, H.M. Review article: the role of butyrate on colonic function. / H.M. Hamer // *Aliment Pharmacol Ther*. - 2008. - № 27(2): p. 104 - 19.

204. Hawrelak, J.A. The Causes of intestinal dysbiosis: a review / J.A. Hawrelak, S.P. Myers // *Alternative Med. Rev.* – 2004. – Vol. 9, N 2. – P. 180-197.

205. Helicobacter pylori treatment: a role for probiotics / F. Cremonini, F. Canducci, S. Di Caro // *Digest Dis*. – 2001. – Vol. 19. – P. 144–147.

206. Hermosa R., Cardoza R., Rubio M., et al. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma* / In: *Biology and Biotechnology of Trichoderma*. – Elsevier. – 2014. – Vol. 125. – P. 138.

207. Hermosa, R. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma* [Text] / R. Hermosa, R.E. Cardoza, M.B. Rubio [et al.] // *The open Mycology Journal*. – 2014. – Vol. 8. – P. 127–139.

208. History, present situation, and prospects of probiotic research conducted in the G. N. Gabrichevsky Institute for Epidemiology and Microbiology / V. A. Aleshkin, A. M. Amerhanova, V. V. Pospelova [et al.] // *Microbial Ecology in Yealth and Disease*. – 2008. – Vol. 20. – P. 113–115.

209. Hold, G.L. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rRNA sequence analysis / G.L. Hold, S.E. Pryde, V.J. Russel // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 2002. - Vol. 39. - P. 33 - 39.

210. Holt A., Killian J.A. Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models// *Eur. Biophys. J.* – 2010. – Vol. 39. – P. 609-621.

211. Hopkins. M.J. Age and disease related changes in interstinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles / M.J. Hopkins // *Gut*. – 2001. – Vol. 48, N 2. – P. 198-205.

212. Howell C.R., The Role of Antibiosis in Biocontrol; in Harman G.E. and Kubicek C.P., eds., *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. Enzymes, Biological Control,

and Commercial Applications, Taylor & Francis. - London, 1998. – P. 173-184

213. Influence of a probiotic mixture on antibiotic induced microbiota disturbances / S. Forssten [et al.] // World. J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, N 33. – P. 11878-11885.

214. Intestinal Dysbiosis and Depletion of Butyrogenic Bacteria in Clostridium difficile Infection and Nosocomial Diarrhea / V.C. Antharam [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51, N 9. – P. 2884-2892.

215. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus / A. Hevia [et al.] // mBio. – 2014. – Vol. 5, N 5. – P. 1-10.

216. Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease / W. Zi-Kai [et al.] // World. J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, N 40. – P. 14805-14820.

217. Intestinal Microbiota, Probiotics and Prebiotics: Comprehensive Textbook for Health Professionals / ed. Rok Orel. – Ljubljana, Slovenia. 2014. – 299 p.

218. Isolauri, E. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: a novel target in allergic disease / E. Isolauri [et al.] / Curr. Pharm. Des. — 2008. — Vol. 14, №14. — P.1368–1375.

219. Isolauri, E. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation / E. Isolauri, P.V. Kirjavainen, S. Salminen // Gut. – 2002. – Vol. 50, N 3. – P. 54-59.

220. Kawamata, K. Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum. / K. Kawamata, H. Hayashi, and Y. Suzuki // Pflugers Arch, - 2007. - 454(2): - P. 253-62.

221. Kubicek, C.P. *Trichoderma* and *Gliocladium* [Text] / C.P. Kubicek, G.E. Harman // Basic biology, taxonomy and genetics. – 2002. – Vol. 1. – P. 3-12.

222. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea: a multicenter European trial / S. Guandalini, L. Pensabene, M. Zikri // J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. – 2000. – Vol. 30. – P. 54–60.

223. *Lactobacillus GG* in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections / I. Hojsak, S. Abdović, H. Szajewska // Pediatrics. – 2010. –

Vol. 125(5). – P.1171–1177.

224. Li, H. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. / H. Li // Proc Natl Acad Sci U S A, - 2003. - 100(14): - P. 8412-7.

225. Liu, J. Remodeling of the gut microbiota and structural shifts in preeclampsia patients in South China / J. Liu, H. Yang, Z. Yin [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2017. – Vol. 36, №4. – P.713–719.

226. Lodge R.M., Hinshelwood C.N. Physicochemical Aspects of Bacterial Growth. Part IX. The Lag Phase of Bact. Lactis Aerogenes // J. Chem. Soc. 1943 P. 213–219

227. Lv, L.J. Early-Onset Preeclampsia Is Associated With Gut Microbial Alterations in Antepartum and Postpartum Women / L.J. Lv [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. – 2019. – Vol. 9. – P.224.

228. Mackie, R.I. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract / R.I. Mackie, A. Sghir, H.R. Gaskins // Am. J. Clin. Nutr. — 1999. — Vol. 69, №5. — P. 1035–1045.

229. Marteau, P. Tolerance of probiotics and prebiotics / P. Marteau, P. Seksik // J. Clin. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 38. – P. 67–69.

230. Membrez, M. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. / M. Membrez // FASEB J. – 2008. - № 22. – P. 2416-2426.

231. Microbial Dysbiosis Is Associated with Human Breast Cancer / C. Xuan [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 1. – P. 1-7.

232. Morrison, D.J. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? / D.J. Morrison // Br J Nutr, - 2006. - № 96(3). - P. 570-7.

233. Mshvildadze, M. The infant intestinal microbiome: Friend or foe? / M. Mshvildadze, J. Neu //Early Hum. Dev. – 2010. – Vol. 86, №1. – P.67-71.

234. Mugambi, M.N. Application of evidence on probiotics, prebiotics and synbiotics by food industry: a descriptive study / M.N Mugambi, T. Young, R. Blaauw

// BMC Res. Not. – 2014. – Vol. 7. – P. 754-762.

235. Neuman, M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. / M.G. Neuman, // *Transl Res*, - 2007. - № 149(4). - p. 173-186.

236. Newman, D.J. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [Text] / D.J. Newman, G.M. Cragg // *J Nat Prod*. – 2012. – Vol. 75 (3). – P.311–335.

237. Nilsson, U. Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerisation and solubility. / U. Nilsson and M. Nyman // *Br J Nutr*, - 2005. - № 94(5) - P. 705-13.

238. O'Toole, G. A. Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // *Ann. Rev. Microbiol*. – 2000. – Vol. 54. – P.49–79.

239. Orel, R. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease / O. Rok, T. Kamhi Trop // *World. J. Gastroenterol*. – 2014. – Vol. 20, N 33. – P. 11505-11524.

240. Ott, S.J. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease / S.J. Ott [et al.] // *Gut*. — 2004. — Vol. 53, №5. — P.685–693.

241. Pavlovskaya N. The biological activity of subspecies *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*, the causative agent of fusarium wilt cucumber in vitro / Ninel Pavlovskaya, Irina Gneusheva, Irina Solokhina and Natalya Ageeva / *BIO Web of Conferences* 21, 00021 (2020). Published online: 22 June 2020. DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100021>

242. Park, Y. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. / Y. Park // *JAMA* - 2005. - № 294(22) - p. 2849-57.

243. Prakash, S. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics / S. Prakash [et al.] // *Biologics*. — 2011. — Vol. 5 — P.71–86.

244. Proa, A. D. Autoimmune disease in the era of the metagenome / A. D. Proal, P.J. Albert, T. Marshall // *Autoimmun. Rev.*—2009. — Vol. 8, №8. — P.677–

681.

245. Probiotic activities of *L. casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties / C. Forestier, C. De Champs, C. Vatoux, B. Jolu // Microbiol. – 2001. – Vol. 152. – P.167–173.

246. Probiotics – a helpful additional therapy for bacterial vaginosis / O. Bodean [et al.] // J. Med. Life. – 2013. – Vol. 6, N 4. – P. 434-436.

247. Rajilic-Stojanovic, M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota / M. Rajilic-Stojanovic, W. M. de Vos // FEMS Microbiol Rev. – 2014. – Vol. 38(5). – P. 996–1047.

248. Rezaie, A. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? / A. Rezaie, R.D. Parker, and M. Abdollahi // Dig Dis Sci, - 2007. - № 52(9). - P. 2015-21.

249. Roda, A. A new oral formulation for the release of sodium butyrate in the ileo-cecal region and colon. / Roda, A., et al. // World J Gastroenterol, - 2007. - 13(7): - P. 1079-84.

250. Rose, D.J. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. / D.J. Rose // Nutrition Reviews. - 2007. - № 65(2). - P. 51-62.

251. Ryder, M. A. Catheter-Related Infections: Its All About Biofilm / M. A. Ryder // Topics in Advanced Practice Nursing J. – 2005. – Vol. 5 (3).

252. Saksirirat et al. Saksirirak W., Chareerak P. and Bunyatrachata W., Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and ray leaf spot in tomatoes, As. J. Food Ag-Ind., Special Issue, 2009; 99-104.

253. Samuel, Yang. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings / Yang Samuel, E. Rothman Richard // Lancet Infect Dis. – 2004. – Vol. 4. - №6. – P.337–348.

254. Scheppach, W. The butyrate story: old wine in new bottles? / W. Scheppach and F. Weiler, // Curr Opin Clin Nutr Metab Care, - 2004. - № 7(5): - P. 563-7.

255. Sivasithamparam K. and Ghisalberti E.L., Secondary metabolism in

*Trichoderma* and *Gliocladium*; in Harman G.E. and Kubicek C.P., eds., *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis. - London 1998. – P.139-149

256. Skrzydlewska, E. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. / E. Skrzydlewska // World J Gastroenterol, - 2005. - № 11(3). - P. 403-406.

257. Soderborg, T.K. The gut microbiota in infants of obese mothers increases inflammation and susceptibility to NAFLD / T.K. Soderborg [et al.] // Nat Commun. – 2018. – Vol. 9, №1. – P.4462.

258. Stoppacher N., Neumann N.K.N., Burgstaller L., et al. The comprehensive peptaibiotics database. // Chem. Biodiv. – 2013. – Vol. 10, №5. – P. 734-743.

259. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L. and Vagvolgyi C., Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review, Acta // Microbiol. Immunol. - Hungary, 2005. – 52. – P.137-68. DOI10.1556AMicr.52.2005

260. The administration of probiotics and synbiotics in immune compromised adults: is it safe? / M. van den Nieuwboer [et al.] // Beneficial Microbes. – Vol. 1, N 1. – P. 1-15.

261. The overarching influence of the gut microbiome on end-organ function: the role of live probiotic cultures / L. Vitetta [et al.] //Pharmaceuticals. – 2014. – Vol.7, N 9. – P. 954-989.

262. Toden, S. Dose-dependent reduction of dietary protein-induced colonocyte DNA damage by resistant starch in rats correlates more highly with caecal butyrate than with other short chain fatty acids. / S. Toden // Cancer Biol Ther. - 2007. - № 6(2). - P. 253-8.

263. Tyakht, A.V. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia / A.V. Tyakht [et al.] // Nat Commun. – 2013. – Vol.4. – P.1-9.

264. Walsh, S.V. Modulation of tight junction structure and function by cytokines. / Walsh, S.V., A.M. Hopkins, and A. Nusrat // Adv Drug Deliv Rev. - 2000. - № 41(3) - p. 303-13.

265. Weeraya Phupiewkham, Pisan Sirithorn, Weerasak Saksirirat and Sompong

Thammasirirak. Antibacterial Agents from *Trichoderma harzianum* Strain T9 Against Pathogenic Bacteria Chiang / Mai J. Sci. – 2015. - 42(2). – P. 304-316  
<http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/> Contributed Paper

266. Weindling R., Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi // *Phytopathology*. – 1934. – 24. – P. 1153-1179.

267. Wong, C.S. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenic events in rats. / C.S. Wong // *Dis Colon Rectum*, - 2005. - № 48(3). - p. 549-59.

268. Yang, Y. Microbial imbalance and intestinal pathologies: connections and contributions / Y. Yang, C. Jobin. // *Dis. Models Mechanisms*. – 2014. – Vol. 7, N 10. – P. 1131-1142.

## Report on DNA BarCoding of fungal culture

Prepared by Project Ass. DI Komal Chenthamara Kariyankode  
TU Wien, Microbiology Group

### Background:

Sample containing fungal spores was obtained on June 16, 2015 from Prof. Dr. N. Pavlovskaya (Orel, Russia).

### Aim of the work:

Obtain molecular identification of these strain

### Preparation:

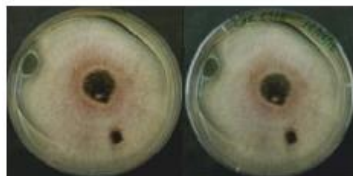
Before cultivation culture was assigned to the following number (Table 1):

Original sample ID	Assigned TUCIM
14	5516

Table 1 showing TUCIM number assigned to the strain

### Cultivation:

The strain was cultivated on MEA (malt extract agar) + chloramphenicol (400 µg/ml) plates covered with cellophane on them at 25° C under 12h cyclic illumination conditions. The morphology of the plates after 72 hours of incubation is shown on Figure 1.



5516

Figure 1. Macromorphology of trains on MEA plates

Visual morphological examination resulted in putative identification of TU CIM 5516 as a mixed culture of *Trichoderma* sp. and *A. niger*.

### Phylogenetic marker used for identification

The *tef1\_int4*(large) phylogenetic marker – Figure 2 was used for the molecular identification

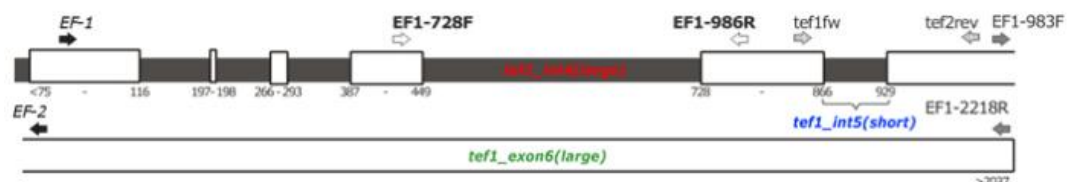


Figure 2. Map of *tef* phylogenetic markers (modified from Druzhinina, I. and Kubicek, C. P. (2005) Species concept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(2), 100 - 112;



### Primers used for amplification

For PCR amplification the following primers have been used (Druzhinina et al., 2008):

*EF1-728F* (5'- CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3')

*TEF1-LLErev* (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3')

### Sanger Sequencing Results

Resulting sequences are given in FASTA format below:

>5516

```
ACATTC AATTGTGCCGACAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTCGACAATTTTCATCACCCCGCTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTTT
GCTGTCGTTTGGTTTTAGTGGGGTCTCTGTGCAACCCCACTAGCTCACTGCTTTTTCTGCTCACTCTCACTTCTCGTCATCATTCAACACGCTCTGTGT
CTTTGGTCATTCAGCGATGCTAACCCTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAAGTTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAG
GCCGAACGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCCGTCATTGGTAGGTCTTCATTAATTTTCATG
CTGCAATTGCGGACCCAGTCTAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCAGGCCGATTGCGC
TATCCTCATCATTGCCGCGGTAAGTGGTGGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCTACACCCTGGGTGTC
AGCAGCTCATCGTTCATCAACAAGATGGACTGCAACTGGGCGGAGGCTGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACCTTCATCAAGAAGGT
CGGCTTCAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCCTCCATCTCCGTTTCAACGGTGACAACATGCTCCAGGCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGCTGGG
AGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTTCACCGGCAAGACCCTCCTTGAGGCTATCGATTCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCCACGGACAAGCCCTCCGCTT
TCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATCGGTGGTATCGGAACAGTCCCGTCGGCCGTATCGAGACTGGTATCCTCAAGCCCGGTATGGTCGTACCTTCGCTC
CCTCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTCGTCCAAGGGTGTCCCGGTGACAACGTTGGTTTCAACGTCAAAAAAC
GTTCCGTTAAGGAAATTCGCCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCATGGGTGCCGCTCTTTACCGCTCAGGTCATCGTCATGAA
CCACCTGGCCAGG
```

### Results of the sequence similarity search against NCBI database

Strains	Best Hit	Query Cover	E -Value	Identity	Accession
5516	<i>Trichoderma</i> sp. HV-2014a strain S343 translation elongation factor 1-alpha ( <i>tef1</i> ) gene, partial cds	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ665383.1</a>

Table 2 showing results from NCBI-BLAST identification for the strain

### Final identification profile is given below:

Search Results for: *gpc1*  
Results 1 to 7 of 7

Show the data for selected [cpk 100](#) [accessible](#) [Check all](#) [Clear All](#) [printer-friendly](#)

CPK#	CPK Sequences	col. 1	Species	Location	Notes	Source	
100	<input type="checkbox"/> 100% 1/1	14	location: species: <i>Trichoderma atroviride</i> Caversi et al 2015 morph. species: <i>Trichoderma reesei</i> teleomorph:	CPK#: Nation region, September 2014 country: Russia region: European Russia	cells: 0x1 Periconia hyphae: N hyphal:	data: N extracted on: 18.11.2014 made up: 18.11.2014 isolated on: 18.11.2014	from: Alexander, Nation State University Cell Performance

### References:

- Caverri et al, 2015 <http://www.mycologia.org/content/early/2015/01/25/14-147.abstract>  
 Druzhinina and Kubicek, 2005 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389624/>  
 Druzhinina et al., 2008 <http://mic.sgmjournals.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2008/021196-0?crawler=true&mimetype=application/pdf>



НАЦИОНАЛЬНЫЙ БИОРЕСУРСНЫЙ ЦЕНТР  
Всероссийская коллекция промышленных  
микроорганизмов (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.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
 УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
 «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
 ИМЕНИ Н. В. ПАРАХИНА»

ПРОЕКТ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по цифровизации, научной  
 и инновационной деятельности  
 ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ»

\_\_\_\_\_ Н. А. Березина  
 « 11 » \_\_\_\_\_ 2023 г.

**ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ**

**на производство бактериостатической композиции**

ЛР 20.59.59.000-001-05013607-2023

РЕКОМЕНДОВАНО к утверждению

Декан факультета биотехнологии и  
 ветеринарной медицины

\_\_\_\_\_ В.В. Крайс  
 « 25 » \_\_\_\_\_ 2023 г.

ИСПОЛНИТЕЛИ:

Павловская Н.Е.

Лушников А.В.

Гнеушева И.А.

Срок действия регламента до « 10 » \_\_\_\_\_ 2028 г.

Орел-2023

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
 УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
 «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
 ИМЕНИ Н. В. ПАРАХИНА»

ПРОЕКТ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по цифровизации, научной  
 и инновационной деятельности  
 ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ»

\_\_\_\_\_ Н. А. Березина  
 « 14 » \_\_\_\_\_ 2023 г.

**ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ**

на производство экстракта биомассы консорциума лактобактерий  
*Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus*

ЛР 10.91.10160-001-05013607-2023

РЕКОМЕНДОВАНО к утверждению  
 Декан факультета биотехнологии и  
 ветеринарной медицины

\_\_\_\_\_ В.В. Крайс  
 « 25 » \_\_\_\_\_ 2023 г.

ИСПОЛНИТЕЛИ:

Павловская Н.Е.

Лушников А.В.

Гнеушева И.А.

Срок действия регламента до « 10 » \_\_\_\_\_ 2028 г.

Орел-2023




МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
 УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
 «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
 ИМЕНИ Н. В. ПАРАХИНА»

ПРОЕКТ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по цифровизации, научной  
 и инновационной деятельности  
 ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ»

 Н. А. Березина  
 « 11 » мая 2023 г.

## ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

на производство комбинированного метабнотика для коррекции  
 микробиоценоза кишечника

ТУ 21.20.10.116-001-05013607-2019

РЕКОМЕНДОВАНО к утверждению  
 Декан факультета биотехнологии и  
 ветеринарной медицины

 В.В. Крайс  
 « 25 » апреля 2023 г.

ИСПОЛНИТЕЛИ:

Павловская Н.Е. Лушников А.В. Гнеушева И.А. 

Орел-2023

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
 УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
 «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
 ИМЕНИ Н. В. ПАРАХИНА»

ПРОЕКТ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по цифровизации, научной  
 и инновационной деятельности  
 ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ»

\_\_\_\_\_ Н. А. Березина  
 « 11 » \_\_\_\_\_ 2023 г.

### ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

на производство комбинированного метабютика для коррекции  
 микробиоценоза кишечника

ТИ 21.20.10.116-001-05013607-2019

РЕКОМЕНДОВАНО к утверждению  
 Декан факультета биотехнологии и  
 ветеринарной медицины

\_\_\_\_\_ В.В. Крайс  
 « 15 » \_\_\_\_\_ 2023 г.

ИСПОЛНИТЕЛИ:

Павловская Н.Е. *Н.Е. Павловская*Лушников А.В. *А.В. Лушников*Гнеушева И.А. *И.А. Гнеушева*

Орел-2023

для внутреннего пользования

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
Н.В. ПАРАХИНА»

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по цифровизации, научной  
и инновационной деятельности  
ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ»

Н.А. Березина

« 11 » мая 2023

Свидетельство о валидации № 10-18/1

Метод «Определение массовой доли экстракта культуральной жидкости *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434 в составе готовой биопродукции», валидирован в соответствии с МУ № 3.3.2.1886-04 «Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представление результатов».

Область применения метода: определение массовой доли аналита в готовых лекарственных формах, и на этапах технологического процесса их приготовления.

В результате валидации установлены следующие показатели точности метода:

Диапазон определяемых величин – массовая доля ( $\omega$ ): 1 – 10%.

Повторяемость:  $CV = 1,69\%$

Воспроизводимость  $CV_1 = 1,68\%$ ;  $CV_2 = 1,78\%$ ;  $F_p = 1,09$ ;  $F_T = 3,44$

Правильность:  $R = 100,1\%$

ИСПОЛНИТЕЛИ:

Лушников А.В. *Луш*

Гнеушева И.А. *И.А.*

Гагарина И.Н. *И.Н.*

РЕКОМЕНДОВАНО к утверждению

Декан факультета биотехнологии и  
ветеринарной медицины

В.В. Крайс

2023 г.



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по УМР

ФГБОУ ВО Орловский ГАУ

д.т.н., профессор

О.В. Евдокимова

« 23 » 11 2023 г.



## АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс

№ 3 от « 22 » 11 2023 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., заведующая кафедрой Биотехнологии Горькова И.В., члены комиссии: профессор кафедры Продукты питания животного происхождения Мамаев А.В., доцент кафедры Биотехнологии Гагарина И.Н. 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. «Бактериостатическая композиция в составе метабитоика для коррекции микробиоценоза кишечника» используются при проведении занятий по дисциплинам: «Технология антибиотиков» и «Медицинская биотехнология» 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

Горькова И.В.

Содержание настоящего Акта подтверждаем:

Профессор кафедры Продукты питания  
животного происхождения

Мамаев А.В.

Доцент кафедры биотехнологии

Гагарина И.Н.

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 дермоваскуляционную реакцию, 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 см<sup>3</sup> выпаренного остатка ацетонового экстракта субстанции. В качестве контроля испытанию 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 трие суток мышам 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 втирают, 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 (испытываемые 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.



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



#### АКТ

**сравнительных комиссионных испытаний бактериостатической композиции метаболитов *Trichoderma atrovirideum* 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. atrovirideum* на КМЦ основе;
2. определить микробиологическую чистоту;
3. определить аллергенность;
4. определить безвредность полученной композиции.

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

Бактериостатическая композиция изготовлена путем соединения препарата метаболитов *T. atrovirideum* F-1434 (ВКПМ), полученных по ЛТР №1 от 18.07.2018 ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ», и раствора карбоксиметилцеллюлозы (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. atrovirideum* была доведена до 3% (v/v) 0,5% раствором КМЦ.

Смешивание препарата метаболитов *T. atrovirideum* 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 atrovirideum* 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 дисперсионной 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  
(подпись)

Начальник цеха ПБП  
(подпись)

Микробиолог ОБТК  
(подпись)

  
(подпись)

  
(подпись)

  
(подпись)

Н. Н. Мятечкин  
(фамилия, инициалы)

Г. С. Зулев  
(фамилия, инициалы)

А. Г. Рошупкина  
(фамилия, инициалы)













**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*