

На правах рукописи

Евдокимов Иван Юрьевич

**РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУР НА
ОСНОВЕ *BACILLUS TOYONENSIS* B-13249 И *B. PUMILUS* B-13250**

1.5.6 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Алтайский государственный университет»

Научный руководитель: **Ирkitова Алёна Николаевна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии, биохимии и биотехнологии Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Официальные оппоненты: **Соловьева Ирина Владленовна**, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией микробиома человека и средств его коррекции Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»

Веснина Любовь Викторовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории водной экологии Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт водных и экологических проблем Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова»

Защита состоится «29» марта 2024 г. в 9:00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. 8(383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

И.о. ученого секретаря диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Одна из главных проблем XXI века – нехватка продовольствия во всё большем количестве стран. За счет изменения структуры и повышения качества потребляемых продуктов питания возможно частично решить данную проблему. Промышленное разведение аквакультуры для получения продуктов питания водного происхождения могут играть ключевую роль в решении продовольственной проблемы. Разведение водных животных широко распространено в прибрежных странах, таких как Индия, Тайланд, Мексика, Россия и др. (Salunke et al., 2020; Sampantamit et al., 2020; Cortes et al., 2021). Среди самых перспективных отраслей аквакультуры можно выделить креветочную, продукция которой превышает миллионы тонн в год (Терааморндеч et al., 2019).

Промышленное культивирование креветок имеет свои особенности. Так, на определенных ранних стадиях развития (от нескольких дней до 3–5 недель), молодь всех промышленно-культивируемых видов, нуждается в подвижности корма. Активное питание, а соответственно и рост организма, происходит только при самостоятельном передвижении кормовых единиц, неподвижные или свободноплавающие частицы корма остаются без внимания. Причем касается это не только действительно хищных видов, как тигровая креветка (*Penaeus monodon* Fabricius), но и популярных всеядных видов, таких как белоногая креветка (*P. vannamei* Boone) и креветка Розенберга (*Macrobrachium rosenbergii* De Man). С учетом указанной особенности питания ракообразных в качестве оптимального стартового корма их личинок стали использовать планктонных галофильных рачков рода *Artemia*, широко распространенных в соленых озерах Западной Сибири.

При разведении ракообразных фермеры часто встречаются с различными инфекциями объектов производства и, как следствие, массовой смертностью водных животных. К болезнетворным микроорганизмам в водной среде относятся представители pp. *Vibrio* (Interaminense et al., 2014), *Salmonella*, *Escherichia* (Lekshmy et al., 2014; Faridullah et al., 2016) и многие др. Для предотвращения крупных потерь при воспроизводстве промысловых объектов, долгие годы применялись антибиотики, что со временем привело к развитию генов резистентности к ним у большинства микроорганизмов. Чтобы устойчивость бактерий к антибиотикам не привела к экологической катастрофе, перед учеными и производителями аквакультуры стоит задача поиска безопасных способов борьбы с патогенными микроорганизмами. В последние годы все большую популярность набирают пробиотики, которые могут быть использованы в профилактических целях для предотвращения развития инфекций (Шульгина и др., 2015; Ahmadifard et al., 2019; Goh et al., 2023).

Оздоровляющие свойства пробиотиков заключаются в антагонизме к патогенным микробам и их метаболитам, в создании благоприятных условий для представителей нормофлоры и снабжении организма-хозяина биологически активными веществами. Являясь транзиторными микроорганизмами, представители рода *Bacillus*, даже при приобретении резистентности к антибиотикам, не успевают передать данные гены представителям патогенной

микробиоты. Вследствие чего, биологические риски при использовании пробиотиков на основе бацилл минимальны.

В настоящее время биопрепараты для аквакультуры часто производятся в жидком виде (Аквапурин™, Пролам™, СТФ-1/56™, Akwa-Biot-Norm™ и т.д.). Сроки хранения таких продуктов ограничены, а их стоимость в пересчете на сухой остаток действующего вещества, намного выше аналогов в высушенном виде (СубПРО™, Бацелл-М™, Субтилилн™ и т.д.). Современным вектором развития в технологии производства биопрепаратов является снижение себестоимости производства, которое можно достичь использованием в качестве субстратов вторичных ресурсов переработки растительного сырья, которое может использоваться в качестве основных компонентов сред для культивирования, а также в качестве наполнителей готового продукта. Использование в качестве компонентов сред побочных ресурсов промышленного производства (меласса, кукурузный экстракт и др.) способствует решению как экономических, так и экологических задач при производстве биологических препаратов, в том числе пробиотиков для аквакультур.

Цель исследования: разработать пробиотический препарат для аквакультур на основе композиции споровых бактерий *V. toyonensis* В-13249 и *V. pumilus* В-13250 и оценить его эффективность.

Задачи исследования:

1. Изучить комплекс культурально-биохимических свойств штаммов *V. toyonensis* В-13249 и *V. pumilus* В-13250: антагонистическую активность к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, антибиотикорезистентность, разнообразие метаболитов.

2. Разработать рецептуру и технологию производства пробиотического препарата для аквакультур на основе консорциума из *V. toyonensis* В-13249 и *V. pumilus* В-13250.

3. Оценить безопасность разработанного пробиотического препарата на лабораторных животных.

4. Определить эффективность разработанного пробиотического препарата в промышленных условиях на рачках артемии (*Artemia franciscana* Kellogg) и креветках Розенберга (*M. rosenbergii*).

5. Выявить влияние пробиотического препарата на гидрохимию воды в системах замкнутого цикла.

Научная новизна

1. В работе впервые описано проявление антагонизма штаммов *V. pumilus* В-13250 и *V. toyonensis* В-13249 по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, низкая резистентность к массово применяемым антибиотикам, широкий спектр метаболитов, что обеспечивает биотехнологический потенциал использования в качестве основы нового пробиотического препарата для аквакультур.

2. Впервые для *V. pumilus* В-13250 и *V. toyonensis* В-13249 проведен детальный анализ профиля метаболитов: определение наличия веществ белковой природы методом электрофоретического разделения в ПААГ; выявление аминокислот,

витаминов, гормонов и некоторых других классов веществ методом ВЭЖХ-МС/МС.

3. Разработана, теоретически и практически обоснована наиболее эффективная технология производства нового пробиотического препарата для аквакультур, включающая подбор и адаптацию под разные ферментационные объемы посевной среды, основной ферментационной среды, дозы посевного материала, температуры культивирования, рН, времени ферментации каждого штамма, режима проточного центрифугирования, времени лиофильной сушки, заморозки, перемешивании при стандартизации.

4. Впервые получены данные использования нового пробиотического продукта в промышленном производстве аквакультуры: подтверждена стимулирующая активность на выклев рачков артемии и более ранний выход из личиночной стадии креветок Розенберга, также снижение концентрации токсичных соединений в воде по сравнению с контролем, которые свидетельствуют о перспективе использования разрабатываемого препарата в производстве аквакультур.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Результаты проведенного исследования подтверждают: способность бактерий рода *Bacillus*, выделенных из ризосферы, к проявлению антагонизма по отношению к широкому спектру патогенов; низкую устойчивость к массово применяемым антибиотикам; продукции метаболитов разных классов (белки, аминокислоты, витамины, гормоны, органические кислоты и др.). Полученные данные дополняют информацию о биологических свойствах споровых бактерий и могут использоваться в качестве рекомендаций сотрудникам при проведении санитарных мероприятий в условиях промышленного разведения аквакультур.

2. Полученные результаты исследования расширяют знания о биотехнологических возможностях бацилл, в частности об их устойчивости при промышленном культивировании, заморозке, сушке и прочих технологических процедурах, что имеет значение как для фундаментальных, так и прикладных исследований в области промышленной микробиологии, а также при разработке новых биопрепаратов для аквакультур.

3. Разработанный в рамках диссертационной работы пробиотический препарат прошел промышленные испытания на объектах аквакультуры: установлен положительный эффект на цисты рачков артемии, креветки Розенберга, химические показатели воды в системах замкнутого водоснабжения. На производство препарата сформированы первичные нормативно-технические документы: ТУ 10.92.10-001-02067818-2022 и ТИ (приказ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» №589/п), получен патент (Пат. 2799554) и зарегистрирован каталожный лист продукции № 080/007923. Технология производства данного препарата экономически эффективна и обеспечивает получение максимального количества целевого продукта в виде максимального титра обоих штаммов, наибольшего накопления биомассы, получения эффективного готового продукта.

4. Теоретический и практический материал, изложенный в работе, представляет интерес для ученых и практикующих биотехнологов, а также для студентов, магистрантов и аспирантов по специальностям «Биотехнология»,

«Промышленная микробиология», «Аквакультура». Кроме того, полученные данные были использованы при выполнении плановых НИР в ИЦ «Промбиотех» АлтГУ.

Положения, выносимые на защиту

1. Природные штаммы *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 обладают потенциалом для создания пробиотических препаратов для аквакультур, обладая антагонистической активностью по отношению к широкому спектру патогенов, малой резистентностью к широко применяемым антибиотикам, большим количеством метаболитов разных классов.

2. Условия подготовки посевного материала в шейкере-инкубаторе (L-среда с начальным рН – 6,8, температура – 37 °С, длительность культивирования – 24 ч.); условия культивирования штаммов в ферментерах (меласно-кукурузная среда, доза посевного материала 1%, рН – 6,8, температура – 37 °С, уровень растворенного кислорода – 50%, длительность ферментации – 24 ч); условия заморозки и времени промораживания (в камере сублиматора 8 ч при –35 °С или в морозильной камере – не менее 12 ч при –20–25 °С); смешивание концентратов бацилл (в соотношении 3:1 с наполнителем в течении 60 мин в смесителе с достижением однородности готового продукта – 98% и выше), обеспечивают оптимальную технологию производства нового поликомпонентного пробиотического препарата для аквакультур на основе консорциума *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249.

3. Разработанная технология позволяет достичь максимального количества живых микроорганизмов – 1×10^9 КОЕ/мл в основной культуральной жидкости ферментера, 1×10^{10} КОЕ/г – в концентрированной биомассе, после лиофилизации – не ниже 1×10^{11} КОЕ/г.

4. Стандартизированный пробиотический препарат сохраняет органолептические свойства и жизнеспособность микроорганизмов на уровне 1×10^{10} КОЕ/г не менее 12 месяцев.

5. Разработанный пробиотический препарат на основе штаммов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 в промышленных условиях при работе с объектами аквакультуры стимулирует выклев и увеличивает количество биомассы *A. franciscana*, способствует более раннему выходу из личиночной стадии *M. rosenbergii*. При этом не оказывает негативного влияния на гидрохимические показатели воды в установках замкнутого водоснабжения.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследований подтверждается их повторной воспроизводимостью, корреляцией экспериментальных данных, полученных с применением независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными и опубликованными нами ранее рукописями.

Результаты работы докладывались и обсуждались на III международном биотехнологическом симпозиуме «Био-Азия Алтай 2021», г. Барнаул, 23–26 сентября 2021 г.; X международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», г. Алушта, 12–16 сентября 2022 г.; VIII Пушинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», г. Пушино, 6–8 декабря 2022 г.; XVIII международной научно-

практической конференции «Аграрная наука – сельскому хозяйству», г. Барнаул, 9–10 февраля 2023 г.; XI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», п. Новомихайловский, 11–14 сентября 2023 г.

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе, 3 публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 в журналах, входящих в реферативные базы Web of Science и/или Scopus, 7 – в других изданиях и материалах конференций. Получен патент на пробиотический препарат для аквакультур.

Личный вклад автора

Заключается в получении экспериментальных результатов, изложенных в диссертации, ведении процессов глубинного культивирования в ферментерах разной вместимости, в постановке задач, обработке и анализе полученных данных, обсуждении, написании и оформлении публикаций. Основная часть всех экспериментальных работ и анализов результатов выполнена лично автором или при его участии. Работа выполнена в 2019–2023 гг.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 150 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждений, выводов, списка цитируемой литературы (источников) и 9 приложений. Диссертационная работа иллюстрирована 23 таблицами и 20 рисунками. Библиографический список включает 303 наименования работ, в том числе 180 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

В данной главе рассмотрены особенности производства объектов аквакультуры в России и мире, а также производственные проблемы и способы их решения. Описаны биологические препараты, используемые при производствах аквакультур, проанализированы микробиологические продукты, испытанные на российских предприятиях. Представлены современные тенденции в технологии производства пробиотических препаратов и основные этапы биотехнологических производств.

2. Материалы и методы

Материалы исследования. Объектом исследования в настоящей работе были два штамма споровых бактерий из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ: *V. toyonensis* В-13249, выделенный из ризосферы р. *Helianthus*, *V. pumilus* В-13250 – из ризосферы р. *Cichorium*.

Все этапы разработки технологии и наработки опытных партий пробиотического препарата для испытаний осуществляли на базе лабораторного комплекса ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

Для проведения промышленных испытаний пробиотического препарата использовали цисты жаброногого рачка *A. franciscana* двух партий лаборатории ООО «Арсал» (г. Яровое, Россия), а также пресноводные креветки Розенберга. Испытания проводили на частной ферме в Респ. Казахстан. Все испытания проходили под руководством директора по развитию ООО «Арсал», канд. с.-х. наук Д. В. Дементьева.

Методы исследования.

Антагонистическую активность штаммов оценивали методом отсроченного антагонизма перпендикулярных штрихов (Ирkitова, Яценко, 2017). В качестве антагонистов использовали *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, в качестве тест-культур – патогенные и условно-патогенные штаммы ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Антибиотикорезистентность исследуемых штаммов определяли диско-диффузионным методом на агаризованной L(Лурия)-среде (Орлова и др., 2020).

Определение содержания БАВ в КЖ производили двумя способами. Для определения наличия белков в надосадочных жидкостях провели электрофоретическое разделение в ПААГ (Laemmli, 1970).

Подробный анализ состава метаболитов произвели методом ВЭЖХ-МС/МС (Rogachev et al., 2021) в лаборатории молекулярной патологии ИМПЗ ФГАОУ ВО НГУ, при содействии канд. хим. наук А. Д. Рогачева.

Условия культивирования в ферментерах. Подбор условий культивирования штаммов проводили в ферментерах объемом 15 л и 250 л, периодического действия, оснащенных механическими перемешивающими устройствами и системами барботирования, производства ООО «Сторге» (Россия).

Исследование полученного пробиотического препарата на предмет острой и хронической токсичности проводили на мышах в лаборатории ветеринарии ФГБНУ ФАНЦА. *Острую токсичность* оценивали после однократного внутрижелудочного введения препарата мышам в дозе 12500 мг/кг (0,25 г/1 мышь). *Хроническую токсичность* оценивали в течении 14 дней при ежедневном скормливании каждой мыши 4000 мг/кг (0,08 г/1 мышь) препарата (Миронов, 2012).

Промышленные испытания препарата. На *A. franciscana*: цисты артемии инкубировали согласно производственным условиям ООО «Арсал» (Evdokimov et al., 2024). На *креветках M. rosenbergii*: потомство одной самки креветки разделили на группы контрольную и опытную, в кормлении которой использовали инкубированную с пробиотическим препаратом артемию (Malkova et al., 2022).

Анализ воды в установках замкнутого водоснабжения. Группы креветок на протяжении месяца выращивали в отдельных замкнутых системах с добавлением в воду пробиотического препарата. С использованием капельных тестов проводили замеры аммонийного, нитритного и нитратного азота (Malkova et al., 2022).

Эксперименты проводили не менее чем в трехкратной повторности. Для статистической обработки данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Достоверным считали различия при уровне значимости $p < 0.05$. Расчет результатов осуществляли с помощью пакетов прикладных программ Statistica 13, MS Excel 2020. В таблицах и графиках приведены данные средних арифметических значений (M) со стандартным отклонением (m).

3. Результаты и обсуждения

Потенциал штаммов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250

Антагонистическая активность. В качестве тест-культур использовали 10 микроорганизмов III и IV групп патогенности: *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*. При оценке антагонистической

активности *B. toyonensis* В-13249 и *B. toyonensis* В-13249 к перечисленным тест-культурам диффузионным методом отметили высокую активность обоих штаммов (таблица 1).

Таблица 1 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов

Штамм	Патогенные тест штаммы / степень воздействия метаболитов штамма бациллы									
	<i>St. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. abony</i>	<i>St. epidermidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Sh. sonnei</i> 32
<i>B. pumilus</i> В-13250	++	-	-	++	-	-	+	++	+	+
<i>B. toyonensis</i> В-13249	++	++	-	++	-	-	++	++	+	+

Примечание: «++» – ослабление роста всего штриха тест-штамма, либо отсутствие визуально наблюдаемого роста штриха тест-штамма; «+» – ослабление роста в начале штриха тест-штамма; «-» – характер роста тест-штамма в опытном варианте не отличается от роста в контроле

В результате *B. pumilus* В-13250 проявил антагонизм к 6 из 10 тест-культур, а *B. toyonensis* В-13249 – к 7 из 10. При этом следует отметить, что антагонистическая активность бацилл проявилась по-разному: в виде ослабления роста штриха тест-штамма, отсутствия визуально наблюдаемого роста штриха тест-штамма или его следовый рост, уменьшения размера колоний патогенов.

Антибиотикорезистентность. В качестве тестируемых использовали 6 широко используемых в аквакультуре, животноводстве и птицеводстве антибиотиков из разных классов (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели чувствительности штаммов к антибиотикам

Антибиотик	<i>B. toyonensis</i> В-13249		<i>B. pumilus</i> В-13250	
	Задержка роста (мм)	Чувствительность	Задержка роста (мм)	Чувствительность
Цефалексин	13,6 (±1,1)	Умеренная	37,9 (±0,7)	Высокая
Олеандомицин	13,2 (±1,2)	Умеренная	17,1 (±1,9)	Умеренная
Энрофлоксацин	10,7 (±0,7)	Умеренная	25,7 (±8,9)	Высокая
Бензилпенициллин	2,8 (±0,2)	Низкая	18,5 (±1,2)	Умеренная
Оксациллин	0	Отсутствует	0	Отсутствует
Мономицин	10,1 (±0,3)	Умеренная	16 (±0,6)	Умеренная

Для обоих штаммов зафиксировали чувствительность к 5 из 6 антибиотиков. Поскольку исследуемые культуры не имеют детерминант резистентности к данным антибиотикам, то они не могут передавать их патогенам и комменсальной кишечной микробиоте хозяев и соответственно, являются биологически безопасными. Но, чувствительность бактерий к указанным антибиотикам следует учитывать при приеме пробиотического препарата.

Продукция метаболитов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249. Оценка накопления белков методом электрофореза белков в ПААГ. При изучении накопления метаболитов белковой природы оба штамма выращивали в качалочных колбах на L-среде (24 ч) в шейкере при 37 °С, центрифугировали и надосадочную жидкость проверяли на наличие белков. Обнаружили, что у *B. pumilus* В-13250 накапливалось несколько белков, размером от 18,4 до 66,2 кДа после культивирования (рисунок 1А). В культуре *B. toyonensis* В-13249 белков накапливалось гораздо меньше, что становилось заметно после концентрирования

(рисунок 1В). При совместном культивировании оба штамма продуцировали весь спектр белков каждого из штаммов.

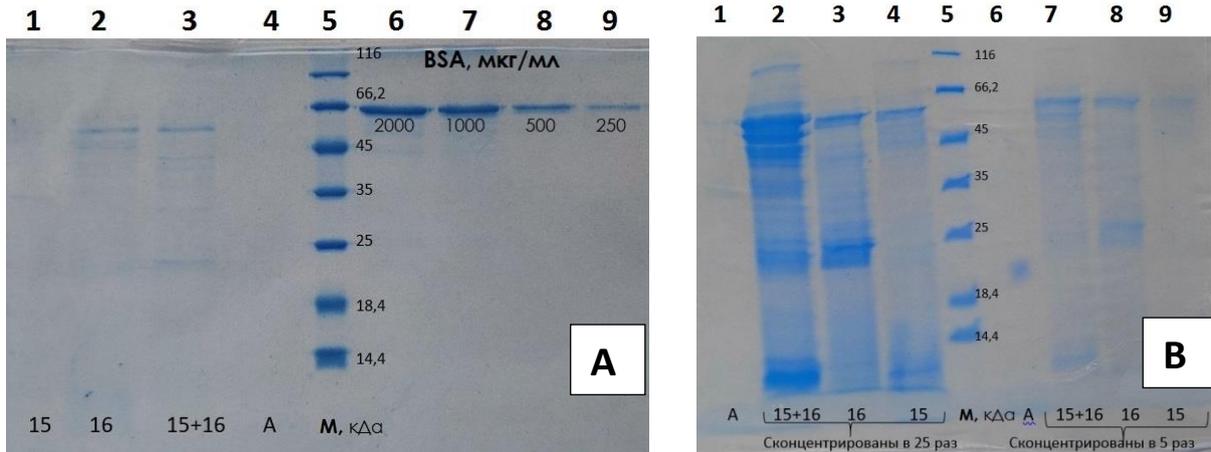


Рисунок 1 – Электрофореграмма разделения белков, после 24 ч культивирования на L-среде:

А – без концентрирования: 1 – *B. toyonensis* В-13249; 2 – *B. pumilus* В-13250; 3 – совместное выращивание *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250; 4 – экспериментальный образец, не учитывается; 5 – маркер; 6–9 – BSA – бычий сывороточный альбумин с известной концентрацией: 2000, 1000, 500, 250 мкг/мл, соответственно.

В – с концентрированием: 1, 6 – экспериментальный образец, не учитывается; 2 – совместное выращивание *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, конц-е в 25 раз; 3 – *B. pumilus* В-13250 конц-е в 25 раз; 4 – *B. toyonensis* В-13249 конц-е в 25 раз; 5 – маркер; 7 – совместное выращивание *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, конц-е в 5 раз; 8 – *B. pumilus* В-13250 конц-е в 5 раз; 9 – *B. toyonensis* В-13249 конц-е в 5 раз.

При масштабировании технологических процессов необходимо учитывать выход продукта и его качество. В данном исследовании при культивировании на среде МК-ОС в 250 л ферментере в течение 24 часов у *B. pumilus* В-13250 дополнительно появился белок на уровне ~ 34 кДа; у *B. toyonensis* В-13249 белки оставались на уровне ~ 36 кДа и ~ 50 кДа (рисунок 2).

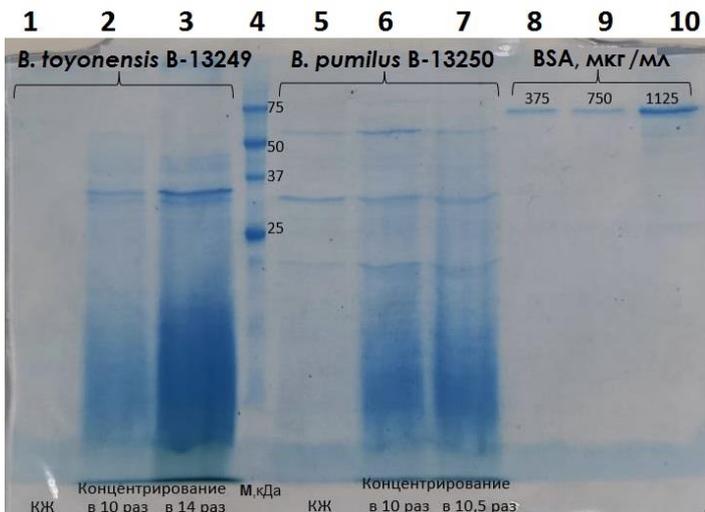


Рисунок 2 – Электрофореграмма разделения белков при культивировании в ферментере (250 л) на МК-ОС после 24 ч наработки: 1–3 – образцы культуральной жидкости *B. toyonensis* В-13249: 1 – без конц-я; 2 – конц-е в 10 раз; 3 – конц-е в 14 раз; 4 – маркер; 5–7 – образцы культуральной жидкости *B. pumilus* В-13250: 5 – без конц-я; 6 – конц-е в 10 раз; 7 – конц-е в 10,5 раз; 8–10 – BSA – бычий сывороточный альбумин с известной концентрацией: 375, 750, 1125 мкг/мл, соответственно.

Таким образом, масштабирование технологического процесса в виде изменения среды и увеличения производственного объема положительно повлияли на накопление белков у *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249.

Оценка накопления метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС. Проанализировали 355 веществ в режиме MRM с использованием переключения положительной/отрицательной поляризации. Выявили 117 метаболитов (рисунок 3), которые достоверно различались между группами. Значимые корреляции

наблюдали для 80 метаболитов у каждого из штаммов. Из них зафиксировали накопление по 43 одинаковым метаболитам, а также по 37 уникальным для каждого штамма.

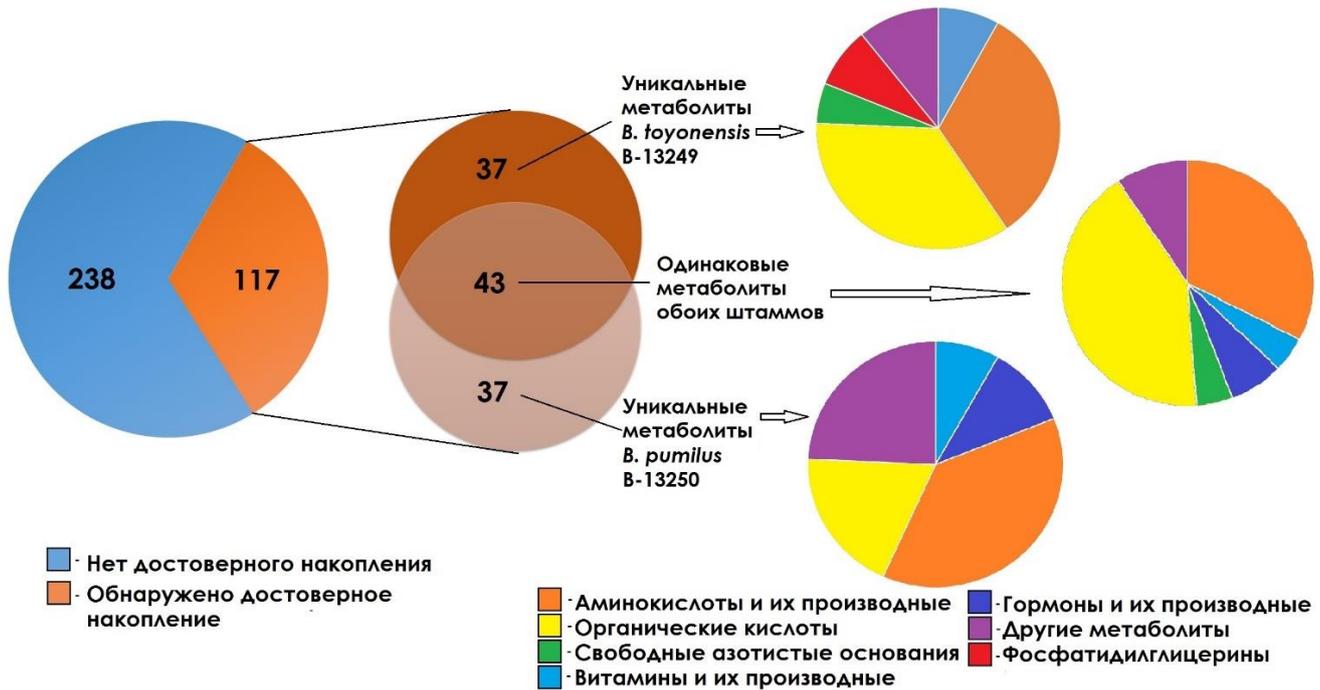


Рисунок 3 – Накопление и определение метаболитов исследуемых штаммов

Следовательно, оба исследованных штамма продуцируют разнообразные метаболиты, в том числе большое количество аминокислот, витаминов группы В, гормонов, органических кислот и многих других, что повышает биологическую ценность пробиотического препарата на их основе.

Разработка технологии производства пробиотического препарата

На рисунке 4 представлена общая схема технологии производства пробиотического препарата для аквакультуры.

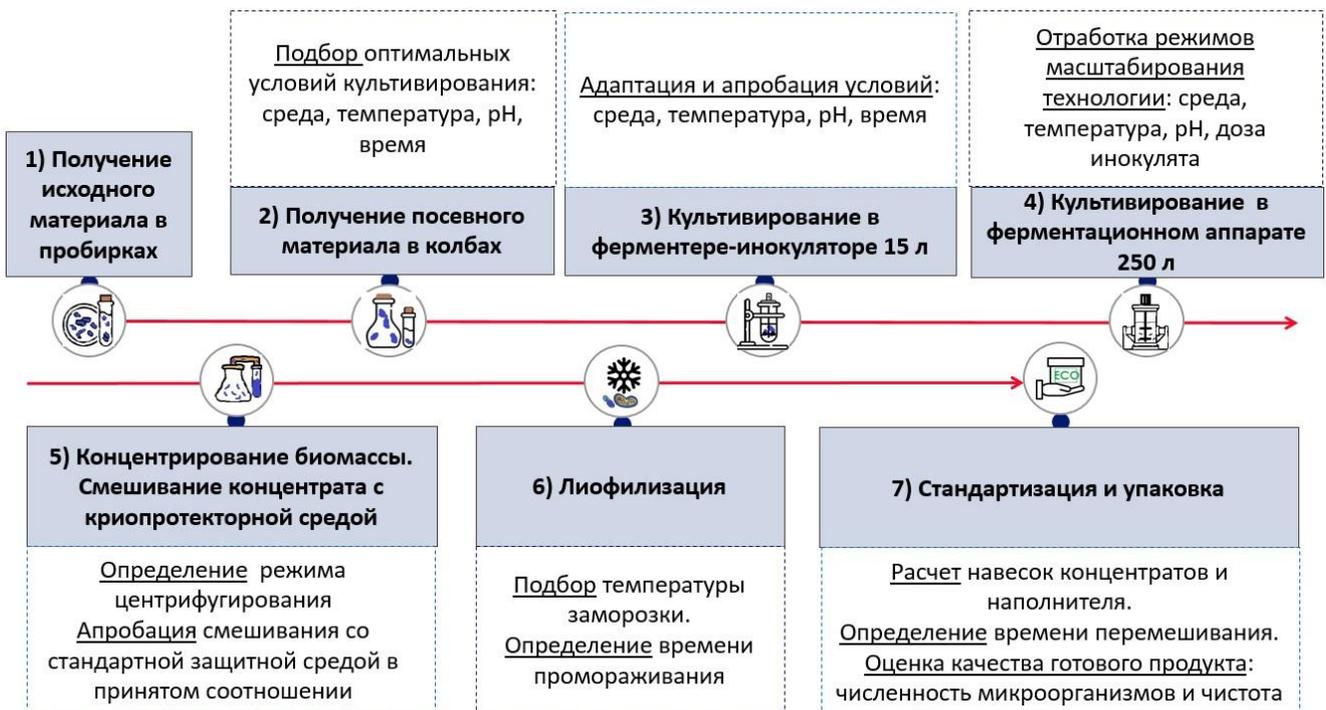


Рисунок 4 – Схема эксперимента. Этапы 1–6 реализуются для каждого штамма отдельно

Определение оптимальных условий глубинного культивирования штаммов. Подбор питательных сред. В качестве среды для посевного материала использовали L-бульон и ГПД. Условия культивирования на данных средах: 37 °С, 18–24 ч. Оба штамма выросли при данных условиях на обеих средах с незначительной разницей в численности (КОЕ/мл): *B. pumilus* В-13250 на ГПД – $4,72(\pm 0,20) \times 10^8$, на L-бульоне – $2,42(\pm 0,12) \times 10^9$; *B. toyonensis* В-13249 на ГПД – $4,60(\pm 0,15) \times 10^8$, на L-среде – $5,91(\pm 0,25) \times 10^9$. При этом, на L-среде в обоих случаях, численность микроорганизмов была выше, чем на ГПД, т.е. она наиболее благоприятна для выращивания посевного материала в колбах (Гребенщикова, 2020). Исследование параметров глубинного культивирования в ферментационном аппарате проводили на трех средах, принципиально различающихся источниками углерода, азота и количеством солей (таблица 3).

Таблица 3 – Технологические показатели ферментации на разных средах

Время, ч	Среда	рН		ОП	
		Штамм			
		<i>B. pumilus</i> В-13250	<i>B. toyonensis</i> В-13249	<i>B. pumilus</i> В-13250	<i>B. toyonensis</i> В-13249
22–24	ПС	7,96 (±0,27)	6,89 (±0,01)	0,984 (±0,007)	1,133 (±0,050)
	МК-БС	8,47 (±0,15)	8,31 (±0,11)	2,284 (±0,051)	1,713 (±0,070)
	МК-ОС	7,89 (±0,19)	8,48 (±0,21)	2,400 (±0,085)	2,042 (±0,042)

Стабильный рост наблюдали у обеих культур на всех средах. При использовании ПС оказалось, что КЖ обеих штаммов имели минимальную ОП, но близкие к нейтральным значения рН. На МК-БС у штамма *B. pumilus* В-13250 показатель ОП был выше, чем на ПС, что подтверждало более правильный выбор компонентов питательной среды для данной культуры. *B. toyonensis* В-13249 также улучшила ОП по сравнению с ПС. Максимальные значения ОП для обеих культур зафиксировали на МК-ОС.

Наименьшая численность и количество сухой биомассы *B. pumilus* В-13250 отмечена на среде ПС, численность *B. toyonensis* В-13249 на ПС также имела низкие показатели. На МК-БС значительно улучшились основные количественные показатели *B. pumilus* В-13250, показатели *B. toyonensis* В-13249 были соизмеримы с ПС. Наибольшую численность и количество биомассы обеих штаммов зафиксировали на МК-ОС (таблица 4).

Таблица 4 – Численность микроорганизмов в жидком и высушенном виде

Среда	Титр, после 24 ч культивирования (КОЕ/мл)		Титр, после сушки (КОЕ/г)		Количество сухой биомассы (г)	
	<i>B. pumilus</i> В-13250	<i>B. toyonensis</i> В-13249	<i>B. pumilus</i> В-13250	<i>B. toyonensis</i> В-13249	<i>B. pumilus</i> В-13250	<i>B. toyonensis</i> В-13249
ПС	$2,44(\pm 0,11) \times 10^9$	$7,70 (\pm 0,35) \times 10^8$	$8,50(\pm 0,40) \times 10^{10}$	$6,50(\pm 0,32) \times 10^{10}$	40,01 (±1,35)	69,79 (±2,77)
МК-БС	$3,89(\pm 0,14) \times 10^9$	$7,20(\pm 0,30) \times 10^8$	$3,10(\pm 0,12) \times 10^{11}$	$4,00(\pm 0,10) \times 10^{10}$	62,99 (±3,15)	69,70 (±2,55)
МК-ОС	$8,30(\pm 0,36) \times 10^{10}$	$2,50(\pm 0,12) \times 10^{10}$	$5,80(\pm 0,25) \times 10^{11}$	$3,60(\pm 0,05) \times 10^{11}$	134,39 (±6,36)	106,22 (±5,22)

Таким образом, наиболее оптимальной для глубинного культивирования для обеих штаммов явилась МК-ОС, поскольку на ней зафиксировали максимальные

значения ключевых показателей: ОП через 24 ч культивирования, вес высушенной биомассы, титр в жидком и лиофилизированном виде.

Подбор дозы инокулята. Для подбора оптимальной дозы инокулята исследовали следующие значения: 1, 5,5 и 10%. Время культивирования во всех вариантах – 24 часа (рисунок 5).

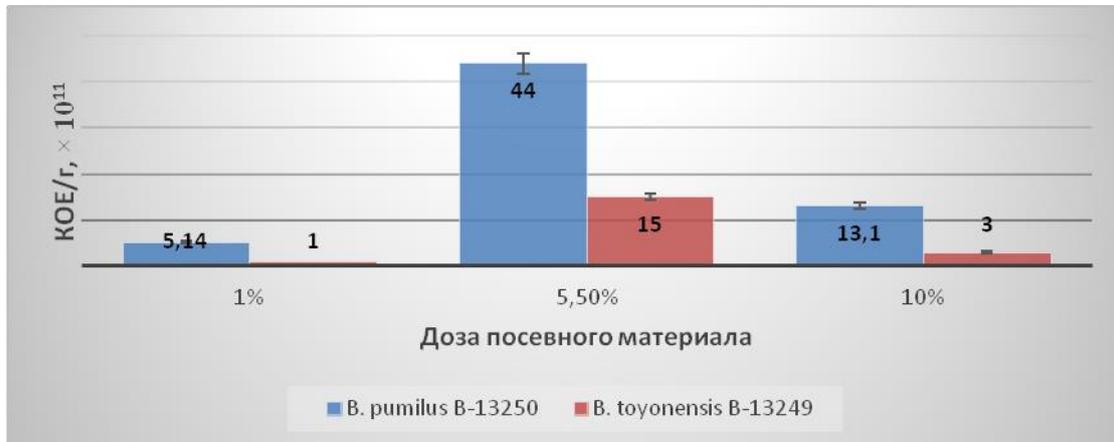


Рисунок 5 – Влияние дозы инокулята на численность микроорганизмов

Анализ посевов показал, что наибольшая численность обоих штаммов наблюдалась с дозой инокулята 5,5%. Однако, следует отметить, что при использовании 1% инокулята количество микроорганизмов оставалось на допустимом технологическом уровне (не менее 1×10^{11} КОЕ/г). К тому же, используя 1% инокулята, стало возможным исключение дополнительной ферментации в инокуляционном аппарате, задействовав только шейкер-инкубатор. Следовательно, применение дозы в 1% экономически наиболее эффективно.

Подбор температуры культивирования. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, с заполнением 200 мл среды, в шейкере-инкубаторе «Innova 44» («New Brunswick», США). Условия культивирования: вращение – 250 об./мин, варианты температур – 15, 25, 30, 37, 42 °С, время – 24 часа. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Технологические показатели культивирования при разных температурах

Температура культивирования, °С	<i>B. pumilus</i> B-13250		<i>B. toyonensis</i> B-13249	
	pH	ОП	pH	ОП
Инокулят	6,85 (±0,01)	0,378 (±0,001)	6,85 (±0,01)	0,568 (±0,002)
15	6,64 (±0,09)	0,089 (±0,004)	6,20 (±0,04)	0,513 (±0,022)
25	6,79 (±0,18)	0,429 (±0,017)	6,72 (±0,01)	0,533 (±0,012)
30	6,76 (±0,18)	0,482 (±0,018)	7,00 (±0,24)	0,858 (±0,022)
37	6,95 (±0,21)	0,574 (±0,017)	6,76 (±0,24)	0,995 (±0,012)
42	7,12 (±0,23)	0,311 (±0,015)	6,60 (±0,31)	0,370 (±0,013)

В результате исследования влияния температуры на *B. pumilus* B-13250 выяснили, что максимальный титр (КОЕ/мл), достигался при температуре 37 °С – $4,60(\pm 0,19) \times 10^9$, что подтверждалось ОП – $0,574(\pm 0,017)$. Наименьшие показатели наблюдались при 15 и 42 °С (КОЕ/мл: $3,40(\pm 0,14) \times 10^8$, $1,00(\pm 0,03) \times 10^9$; ОП: $0,089(\pm 0,004)$, $0,311(\pm 0,015)$). Следует отметить, что *B. pumilus* B-13250 при температуре 15 и 42 °С рос, накапливал количество клеток при всех заданных температурных режимах (рисунок 6).

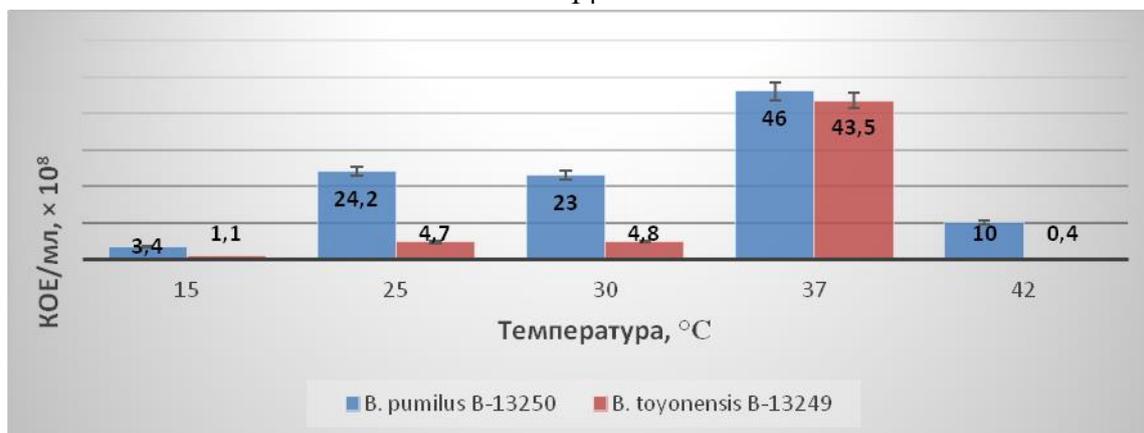


Рисунок 6 – Влияние температуры культивирования на численность микроорганизмов

Результаты исследований оптимального температурного режима *B. toyonensis* B-13249 также показали, что наибольший титр (КОЕ/мл) достигался при температуре 37 °C – $4,35(\pm 0,19) \times 10^9$, при ОП в $0,995(\pm 0,012)$. Наименьшие показатели – также при 15 и 42 °C (КОЕ/мл: $1,10(\pm 0,04) \times 10^8$, $4,00(\pm 0,09) \times 10^7$; ОП: $0,513(\pm 0,022)$, $0,370(\pm 0,013)$). При этом 15 °C – наблюдали минимальный порог развития *B. toyonensis* B-13249, что обуславливалось низкой скоростью внутриклеточных процессов и низкой скоростью размножения. При температуре в 42 °C часть клеток претерпевала структурные изменения и гибли.

Из чего следует, что в состав препарата для аквакультур возможно включение обоих микроорганизмов, исходя из возможности развития культур при отклонении от оптимальных температур (Евдокимов и др., 2022).

Подбор pH культивирования. Условия культивирования аналогичны предыдущему эксперименту, только при температуре 37 °C. Исследовали параметры роста при задаваемых значениях pH: 5,6, 6,2, 6,8, 7,2. Показания pH проверяли в 1, 4, 24 ч роста. В 1-ый и 4-ый час, при отклонении от установки, производили корректировку показаний. Для корректирования значений pH среды использовали 20%-ый раствор гидроксида натрия. Полученные результаты исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Технологические показатели культивирования при разных значениях pH

Уста- вка pH	<i>B. pumilus</i> B-13250				<i>B. toyonensis</i> B-13249			
	pH в момент культ-я			ОП, 24 ч	pH в момент культ-я			ОП, 24 ч
	1 ч	4 ч	24 ч		1 ч	4 ч	24 ч	
Ино- кулят			7,32 (±0,22)	1,025 (±0,051)			7,32 (±0,20)	1,024 (±0,021)
5,6	5,60 (±0,01)	5,63 (±0,02)	6,69 (±0,15)	0,382 (±0,015)	5,68 (±0,05)	5,20 (±0,03)↑	7,02 (±0,21)	0,759 (±0,026)
6,2	6,17 (±0,03)↑	5,75 (±0,12)↑	7,05 (±0,28)	0,530 (±0,014)	6,13 (±0,01)↑	5,30 (±0,02)↑	6,98 (±0,13)	0,656 (±0,017)
6,8	6,52 (±0,06)↑	5,99 (±0,03)↑	7,00 (±0,06)	0,849 (±0,040)	6,57 (±0,08)↑	5,80 (±0,07)↑	7,05 (±0,24)	0,991 (±0,036)
7,4	7,14 (±0,04)↑	6,43 (±0,04)↑	7,10 (±0,15)	0,628 (±0,029)	7,14 (±0,09)↑	6,28 (±0,12)↑	7,32 (±0,11)	0,745 (±0,037)

Наибольшую ОП наблюдали в варианте с pH=6,8 у обеих культур. На 24 ч роста значение активной кислотности стремилось к нейтральному положению, и в

вариантах 5,6, 6,2, 6,8 значение рН в обоих штаммах перерастало изначально заданный уровень.

Наибольшее количество живых клеток через 24 часа культивирования обнаружили на среде с рН=6,8 (рисунок 7).

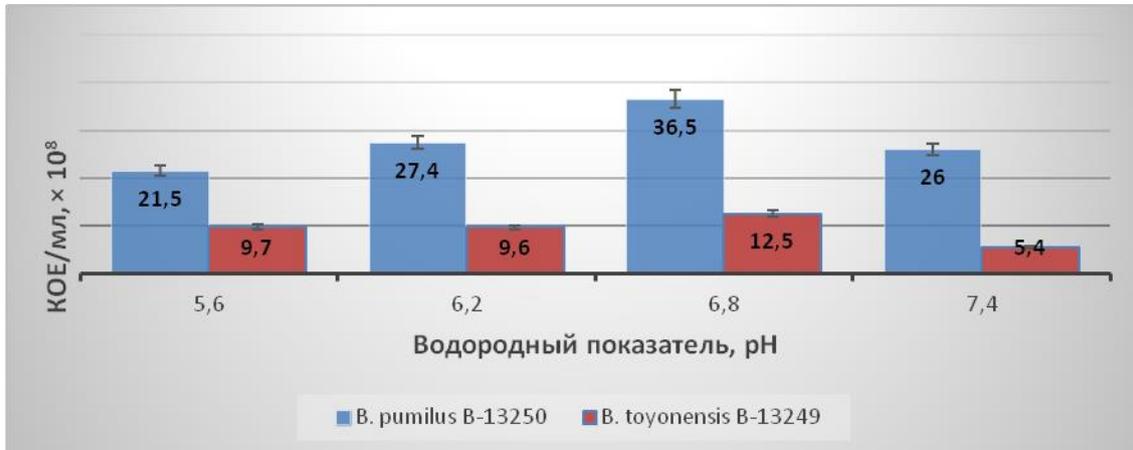


Рисунок 7 – Влияние кислотности среды культивирования на численность микроорганизмов

Таким образом, для обоих штаммов оптимальный показатель активной кислотности среды – 6,8, при этом оба штамма способны расти и размножаться в условиях отклонения от оптимума: в значениях рН от 5,6 до 7,4 (Евдокимов и др., 2023).

Подбор времени культивирования. Условия культивирования аналогичны предыдущим экспериментам, только с установкой температуры 37 °С и рН=6,8. Время культивирования составляло 72 часа.

Определили, что оба микроорганизма, практически сразу после внесения инокулята в ферментационную среду, начинали активно питаться и размножаться, что подтверждалось очень короткой лаг-фазой и минимальным смещением рН в сторону понижения, на протяжении первых двух часов, а также интенсивно растущим показанием ОП до 24 часов, включительно.

К 24 часам роста, количество бактерий набирало наибольшее количество обоих штаммов (рисунок 8). Экспоненциальную фазу зафиксировали для обоих штаммов в период от 2 до 18–20 часов. Начиная с 20–24 часов культивирования наступала стационарная фаза. Через 48 часов ферментации титр незначительно снижался, и дальнейшая тенденция к снижению в пределах порядка продолжилась до 72 часов.

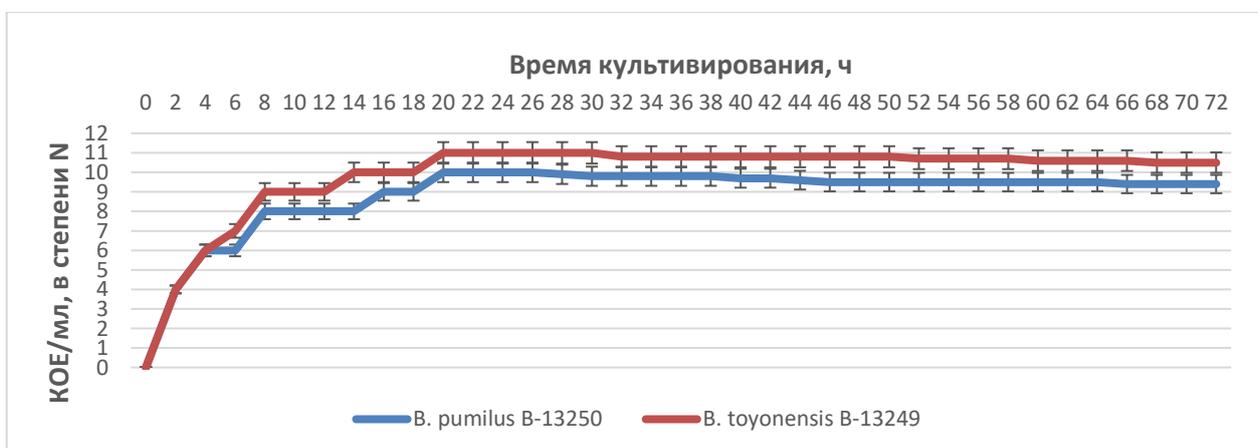


Рисунок 8 – Накопление количества микроорганизмов в течении 72 часов культивирования

Проведение дальнейших исследований стало нецелесообразным, так как к 24 часам контрольный титр (КОЕ/мл) явился максимальным. Количество микробов в другие часы культивирования, практически не менялось, что дало право полагать, что все питательные элементы среды поглощены, а для продолжения ферментации необходимо добавление подпиточной среды, что удорожает производство.

Разработка технологии получения готовой формы препарата.

Концентрирование КЖ. На стадии ферментации были получены КЖ, содержащие бактерии каждого из штаммов (таблица 7).

Таблица 7 – Характеристика культуральной жидкости бактерий

Наименование параметров	Показатели <i>B. pumilus</i> В-13250	Показатели <i>B. toyonensis</i> В-13249
Активная кислотность, рН	7,89 ($\pm 0,19$)	8,48 ($\pm 0,41$)
Содержание клеток, КОЕ/мл	$8,30(\pm 0,36) \times 10^9$	$2,50(\pm 0,12) \times 10^9$
Контаминирующая микрофлора	Отсутствует	Отсутствует
Объем, л	120–180	120–180

Для подбора оптимального режима центрифугирования при максимальных оборотах применяли скорость протока от 70 л/ч до 150 л/ч (таблица 8).

Таблица 8 – Характеристика нативного раствора при изменении скорости протока

Ск-сть, л/ч	Нативный раствор <i>B. pumilus</i> В-13250		Нативный раствор <i>B. toyonensis</i> В-13249	
	Визуальная оценка раствора	Количество клеток, КОЕ/мл	Визуальная оценка раствора	Количество клеток, КОЕ/мл
70	Прозрачный	Отсутствие	Прозрачный	Отсутствие
90	Прозрачный	Отсутствие	Прозрачный	Отсутствие
100	Прозрачный	Отсутствие	Прозрачный	Отсутствие
110	Прозрачный	Отсутствие	Прозрачный	Отсутствие
120	Прозрачный	$12,50 (\pm 0,50)$	Прозрачный	$9,00 (\pm 0,45)$
130	Практически прозрачный	$3,00(\pm 0,10) \times 10^3$	Прозрачный	$2,50(\pm 0,10) \times 10^3$
150	Небольшая мутность	$6,45(\pm 0,20) \times 10^4$	Небольшая мутность	$5,70(\pm 0,25) \times 10^3$

Хорошее разделение КЖ обеспечивалось при скорости протока от 70 л/ч до 120 л/ч. При скорости 130 л/ч в нативном растворе под микроскопом обнаруживались единичные клетки бактерий, при этом визуально жидкость была прозрачной у обеих культур. По мере увеличения скорости потока появлялось помутнение, что подтверждало увеличение количества проскочивших клеток. Оптимальной же скоростью потока, ввиду оптимизации технологических процессов, а также сокращения их времени, явилась – от 100 до 130 л/ч.

Высушивание концентрированной биомассы. Полученный на стадии центрифугирования концентрат бактериальных клеток смешивали с криопротекторной (защитной) средой в соотношении 1:1, перемешивали, заливали в лотки и замораживали.

Проверили 5 вариантов температур в диапазоне от -20 °С (стандартная температура бытовых морозильных камер), до -40 °С (температура заморозки полок сублиматора) с экспозицией 8 часов. Сушку производили согласно предустановленной программе лиофильной сушки. По окончании сушки в сухом концентрате определяли количество бацилл (рисунок 9).

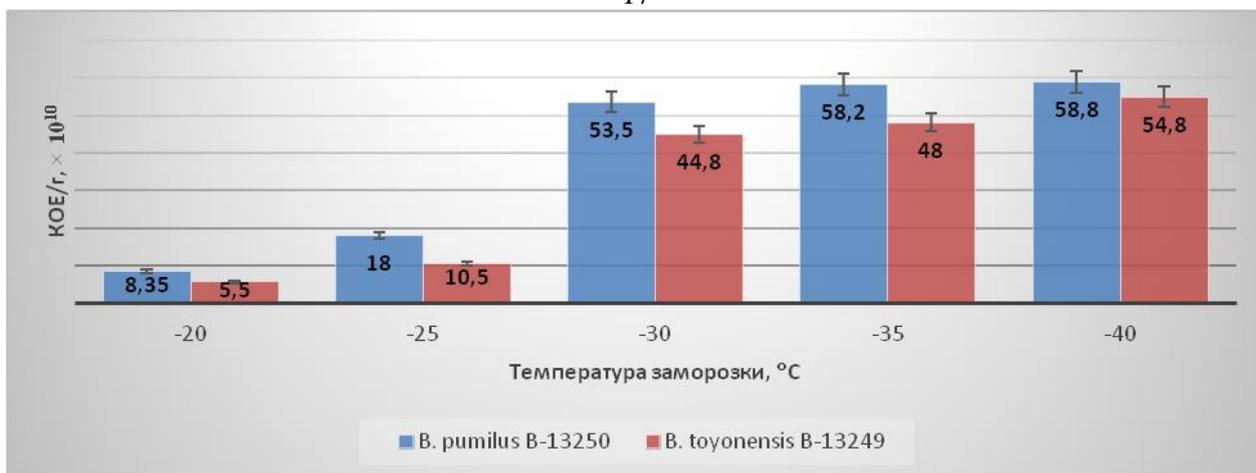


Рисунок 9 – Влияние температуры замораживания на количество микроорганизмов в сухом концентрате

Выявили, что для сохранения максимальной численности бактериальных клеток при сушке, необходимо замораживание в течение 8 часов при температуре от -30 до -40 °C. Так же заметили, что и при -25 °C титр микробов не опустился ниже одной степени, только при -20 °C, количество клеток было ниже.

При установке оптимального времени промораживания изучали временные интервалы 8, 10, 12, 14 часов (рисунок 10).

По полученным данным видно, что оба штамма (*B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249) при увеличении времени заморозки до 12–14 часов при -25 °C и даже -20 °C достигали максимальной выживаемости клеток.

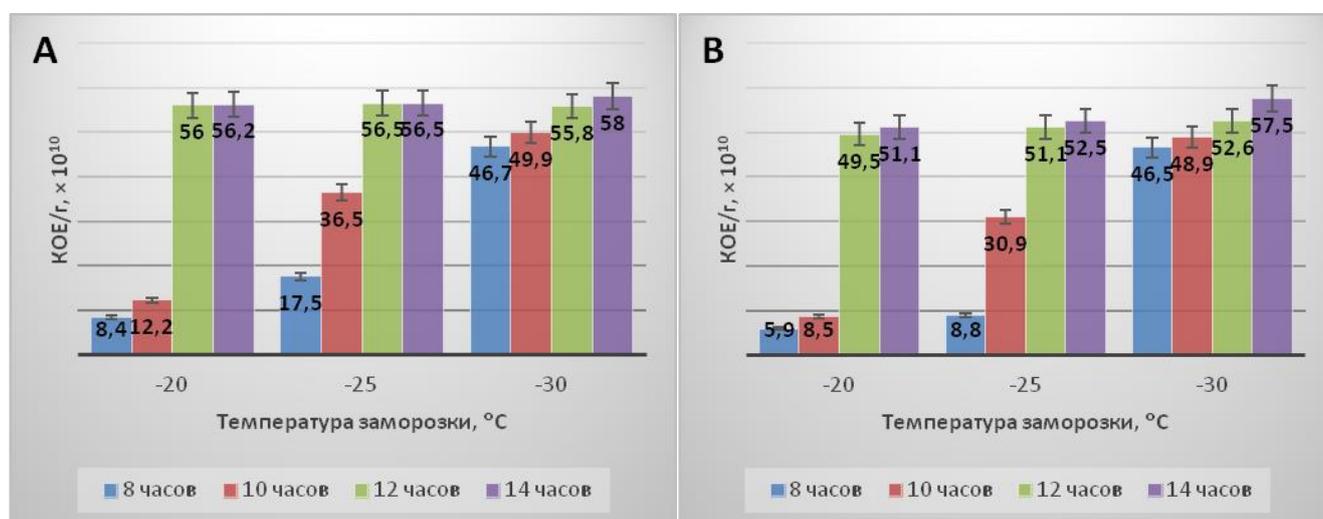


Рисунок 10 – Влияние режима замораживания на количество микроорганизмов в сухом концентрате: А – *B. pumilus* B-13250, КОЕ/г; В – *B. toyonensis* B-13249, КОЕ/г

Таким образом, определили 2 режима замораживания для достижения максимальной выживаемости клеток микроорганизмов: заморозка до $-30/-40$ °C на полках сублиматора, либо более продолжительный режим, около 12–14 часов в морозильном ларе при -20 °C.

Совместное культивирование *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249.

Для оценки биосовместимости и возможного синергического эффекта провели ряд сокультивирований при отработанных оптимальных условиях: посевная среда – L, ферментативная среда – МК-ОС, температура – 37 °C, pH – 6,8. К 20–24 часам

культивирования и у *B. toyonensis* В-13249, и у *B. pumilus* В-13250 заканчивался процесс спорообразования, вегетативных клеток не оставалось.

По микроскопии визуально была заметна разница в морфологии клеток. Титр, по окончании ферментации, не опускался ниже 1×10^9 КОЕ/мл. После центрифугирования оба штамма легко отделялись, не слипались и соответствовали своим первоначальным морфологическим и физиологическим характеристикам. Условия процесса лиофилизации были одинаковыми. Оба штамма легко перенесли сушку и их общий титр составлял $4,36(\pm 0,14) \times 10^{11}$ КОЕ/г. Количество каждого штамма в консорциуме составило не менее 2×10^{10} КОЕ/г (Евдокимов и др., 2022).

Полученные результаты доказали возможность совместного культивирования *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249, а также свидетельствовали о синергическом эффекте и большей стабильности при хранении смешанного концентрата или готового продукта.

Стандартизация препарата. Перемешивание препарата проводили в смесителе «СМУ-ПБ-200» (ООО «Молком», Россия). Стандартизацию препарата до заданных параметров проводили, ориентируясь на численность бактерий в сухих концентратах, пропорционально рассчитывая долю масс сухих концентратов, по отношению к массе наполнителя – мальтодекстрина, до получения 1×10^{10} КОЕ/г.

Выявили, что при перемешивании в течении 60 мин, однородность продукта обеспечивалась, практически, на 98% во всех случаях, поэтому оптимальным временем смешивания для получения готового продукта явился 1 час. Характеристика нового пробиотического препарата представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика полученного пробиотического препарата для аквакультур

Наименование показателя	Значение показателя	Метод анализа
Внешний вид	Порошок, состоящий из наполнителя – мальтодекстрина и лиофильно высушенных концентратов бактерий. Допускается незначительное количество комочков, рассыпающихся при легком механическом воздействии.	Визуальный
Цвет	От белого до светло-кремового с бурыми вкраплениями концентратов бактерий	Визуальный
Вкус и запах	Запах, характерный для мальтодекстрина, слегка сладковатый	Вкусовой, обонятельный
Массовая доля влаги, %, не более	5,0	ГОСТ 24061-2012
Количество жизнеспособных клеток <i>B. pumilus</i> В-13250, <i>B. toyonensis</i> В-13249, КОЕ/г, не менее	1×10^{10}	ГОСТ 31928-2013
Токсичность	Не токсичный	ГОСТ 31674-2012
Микробиологическая чистота	Не допускается наличие патогенной микрофлоры (бактерии рода <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosae</i> ; семейства <i>Enterobacteriaceae</i>).	ГОСТ Р 55291-2012

Установление сроков хранения готового препарата. Для установления минимального срока хранения на протяжении 12 месяцев пробиотический препарат хранили при температуре 5 °С и при комнатной (20 °С), оценивали динамику численности бацилл и посторонней микрофлоры. На протяжении всего времени, численность целевых микроорганизмов сохранилась не ниже 1×10^{10} КОЕ/г, БГКП и других посторонних микроорганизмов не обнаружили. В связи с этим, рекомендуемый срок хранения – 12 месяцев. Однако, первая контрольная партия полученного препарата уже на протяжении более 36 месяцев сохраняет исходные показатели.

Испытания токсичности пробиотического препарата на мышах

Острая токсичность. После введения препарата, в течение первых 10–15 минут, наблюдали снижение двигательной активности, дыхание у мышей было частым и поверхностным. Через 15–20 минут от начала эксперимента, животные начинали дышать более глубоко, прерывисто. Полное восстановление происходило в течение 40–60 минут после введения пробиотического препарата. В контрольной группе признаков интоксикации не отметили.

При дальнейшем наблюдении, никаких видимых отличий по количеству потребляемого корма и воды в опытных и контрольных группах не отметили. На протяжении всего эксперимента, динамика роста массы тела лабораторных животных была положительной (таблица 10).

Таблица 10 – Динамика набора массы тела мышей при введении препарата

Группа животных	1-е сутки, г	7-е сутки, г	14-е сутки, г	Прирост, %
Самцы				
Контрольная (0,5 мл вода)	19,24 (±0,95)	23,71 (±0,83)	27,61 (±0,60)	+ 43,8
Опытная группа (0,5 мл р-ра препарата)	19,85 (±0,02)	23,18 (±0,72)	26,64 (±0,81)	+ 34,3
Самки				
Контрольная (0,5 мл вода)	19,52 (±0,85)	22,32 (±0,50)	25,22 (±0,38)	+ 29,2
Опытная группа (0,5 мл р-ра препарата)	18,94 (±0,43)	21,65 (±0,34)	23,84 (±0,43)	+ 25,9

Результаты исследований показали, что однократное внутрижелудочное введение пробиотического препарата мышам в дозе 12500 мг/кг (0,25 г/1 мышь) не вызвало гибели ни 1 особи.

Хроническая токсичность. При наблюдении за мышами никаких видимых отличий по количеству потребляемого корма и воды в группах не отмечалось. На протяжении всего эксперимента, динамика роста массы тела лабораторных животных всех групп была положительной. Процент прироста живой массы в опытных группах самцов и самок оказался меньше в среднем на 8,9%, в сравнении с контрольными группами (таблица 11).

Таблица 11 – Динамика набора массы тела при исследовании хронической токсичности

Группа животных	1-е сутки, г	7-е сутки, г	14-е сутки, г	Прирост, %
Самцы				
Контрольная (10 мл вода)	18,25 (±0,34)	21,80 (±0,23)	25,98 (±0,23)	+ 42,36
Опытная группа (10 мл р-ра препарата)	18,58 (±0,37)	21,08 (±0,32)	24,93 (±0,76)	+ 34,17

Окончание таблицы 11				
Группа животных	1-е сутки, г	7-е сутки, г	14-е сутки, г	Прирост, %
Самки				
Контрольная (10 мл вода)	18,85 ($\pm 0,39$)	22,13 ($\pm 0,48$)	24,60 ($\pm 0,36$)	+ 30,5
Опытная группа (10 мл р-р препарата)	18,75 ($\pm 0,35$)	21,00 ($\pm 0,31$)	23,55 ($\pm 0,68$)	+ 25,6

Результаты расчета массовых коэффициентов внутренних органов мышей контрольной и опытной групп представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Массовые коэффициенты внутренних органов мышей

Группа животных	Пол животного	Внутренние органы мышей			
		Печень	Почки	Селезенка	Сердце
Контрольная (10 мл вода)	Самки	6,38 ($\pm 0,42$)	1,21 ($\pm 0,04$)	0,48 ($\pm 0,05$)	0,48 ($\pm 0,04$)
	Самцы	6,10 ($\pm 0,24$)	1,42 ($\pm 0,09$)	0,44 ($\pm 0,04$)	0,56 ($\pm 0,03$)
Опытная группа (10 мл р-р препарата)	Самки	5,99 ($\pm 0,04$)	1,24 ($\pm 0,06$)	0,39 ($\pm 0,04$)	0,51 ($\pm 0,02$)
	Самцы	5,54 ($\pm 0,48$)	1,31 ($\pm 0,09$)	0,45 ($\pm 0,06$)	0,55 ($\pm 0,06$)

Результаты исследований показали, что многократное внутрижелудочное введение пробиотического препарата белым мышам в дозе 80 мг/1 мышь в сутки (4000 мг/кг) не вызвало их гибели, не привело к интоксикации, но незначительно снизило динамику прироста живой массы животных в сравнении с контрольной группой. При изучении органов отметили уменьшение массовых коэффициентов печени и селезенки у мышей опытной группы.

Промышленные испытания препарата на объектах аквакультуры

Испытание препарата на рачках артемии. Исследование показало, что в обеих партиях цист артемии добавление пробиотического препарата дало положительный эффект. Результаты исследования на партии цист Z29.04 представлены в таблице 13, а на партии цист С9 – в таблице 14.

Таблица 13 – Результаты 48-часовой инкубации цист партии Z29.04 (оз. Большое Яровое)

Варианты	Навеска препарата (г)	HR, %	CV, % (по HR)	Коэффициент биомассы
Конус 1	0 (контроль)	95,19 ($\pm 2,98$)	3,1	2,65
Конус 2	0,05	94,61 ($\pm 4,89$)	5,2	3,40
Конус 3	0,10	96,53 ($\pm 2,91$)	3,0	3,70
Конус 4	0,20	93,01 ($\pm 5,09$)	5,5	3,55

Процент выклева при добавлении пробиотического препарата к партии Z29.04 менялся не значительно, но в лучшую сторону (на 1,4% максимально). При добавлении к партии С9 отмечали прирост HR примерно на 10%. Коэффициент вариации от 3 до 5% говорил о незначительном разбросе значений, и позволил говорить о достоверности полученного результата.

Таблица 14 – Результаты 48-часовой инкубации цист партии С9 (оз. Кучук)

Варианты	навеска препарата (г)	HR, %	CV, % (по HR)	Коэффициент биомассы
Конус 1	0 (контроль)	79,23 ($\pm 9,37$)	11,8	2,30
Конус 2	0,05	79,85 ($\pm 12,74$)	16,0	3,20
Конус 3	0,10	88,76 ($\pm 5,66$)	6,4	3,40
Конус 4	0,20	83,69 ($\pm 8,23$)	9,8	2,55

Доза в 0,1 г пробиотического препарата на 2 г цист оказала положительный эффект также и на выход биомассы *A. franciscana*, выраженный в массе рачков, полученных после инкубации.

На графике показаны результаты корреляции между применяемой дозой пробиотического препарата и выходом биомассы *A. franciscana* из двух независимых партий, взятых из разных озер (рисунок 11).

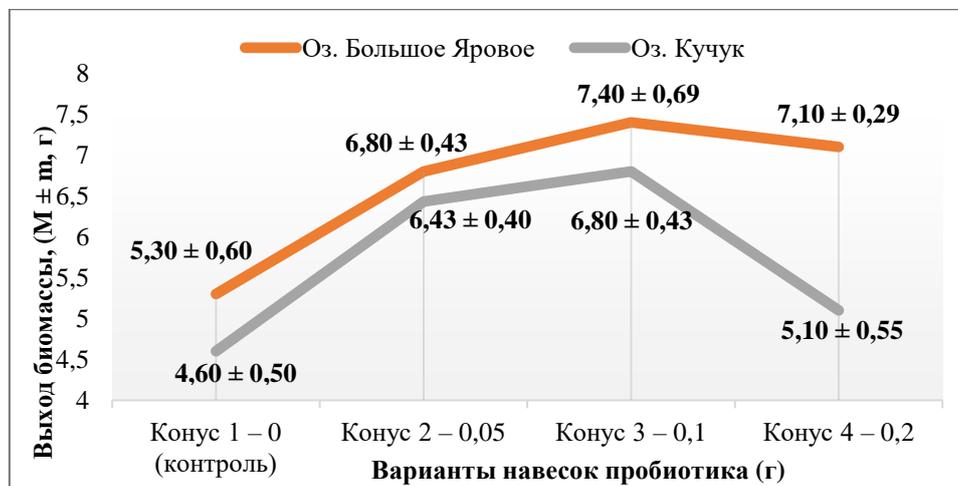


Рисунок 11 – Корреляция между концентрацией пробиотического препарата и выходом биомассы

Из представленных результатов следует, что лучшие показатели процента выклева и выходу биомассы достигнуты при добавлении 0,1 г препарата к 2 г сухих цист (Evdokimov et al., 2024).

Испытания на креветках Розенберга. В опытной группе наблюдали более ранний выход *M. rosenbergii* из личиночной стадии – на 18 день. В контрольной группе – на 28 день (рисунок 12). Выживаемость в обеих группах не различалась и была более 90%.

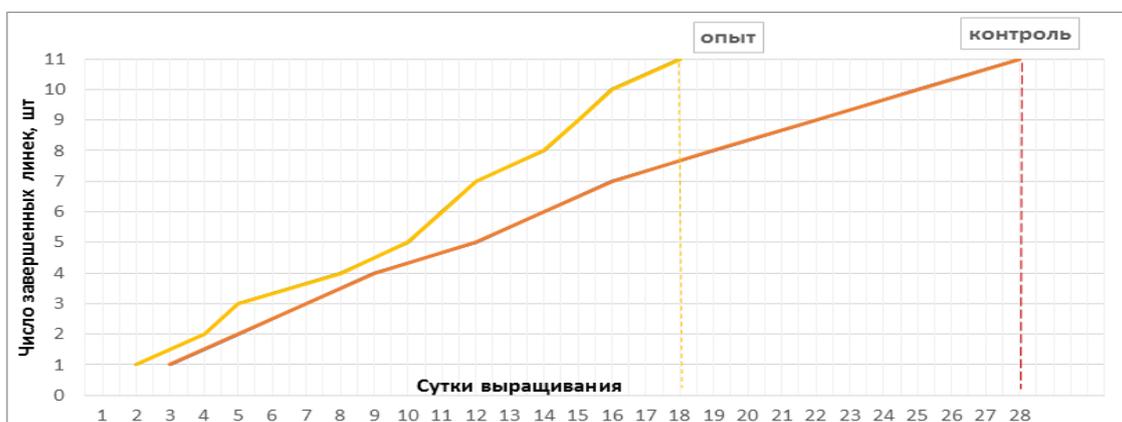


Рисунок 12 – Сроки завершения метаморфоза личинок *M. rosenbergii* в разных группах

Согласно полученным данным, в опытной группе креветок процесс линек завершился на 10 дней быстрее, чем в контрольной. Данный результат свидетельствовал о положительном эффекте пробиотического препарата на скорость прохождения личиночной стадии у *M. rosenbergii*.

Влияние пробиотического препарата на гидрохимию воды в установках замкнутого водоснабжения. В соответствии с полученными данными, отображаемыми на рисунке 13, влияние препарата положительно сказывалось на гидрохимических показателях воды.

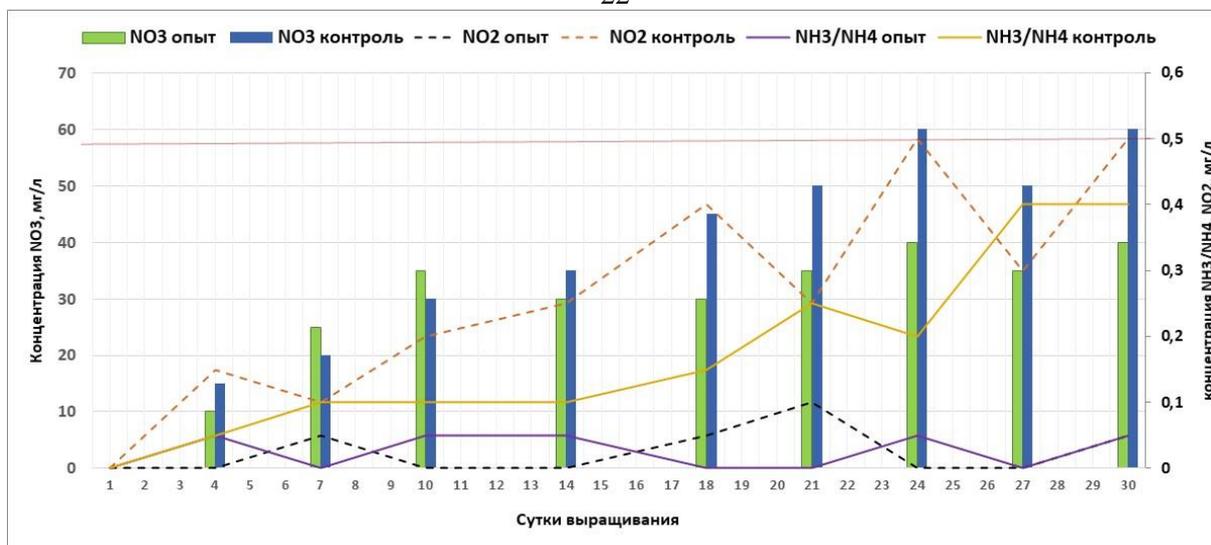


Рисунок 13 – Гидрохимический режим в опытной и контрольной системах

Концентрация аммонийного (NH_4) и нитритного (NO_2) азота в контрольной системе к окончанию эксперимента достигла верхнего предела нормы (0,5 мг/л), в опытной – нет. При норме концентрации нитрата NO_3 до 50 мг/л в контрольной установке на 24 день эксперимента зафиксировали пиковое значение в 60 мг/л. В опытной установке данный показатель не превышал 40 мг/л.

Экспериментально установили первичную дозировку пробиотического препарата для установок замкнутого водоснабжения, объемом 600 л – 5 г/раз в неделю (Malkova et al., 2022).

ВЫВОДЫ

1. Определен комплекс культурально-биохимических свойств штаммов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250:

а) штамм *B. pumilus* В-13250 проявил антагонизм к 6 из 10 исследуемых тест-культур, а штамм *B. toyonensis* В-13249 – к 7 из 10. При этом антагонизм по отношению к тест-культурам *Ps. aeruginosa* 6643 В-1295, *B. subtilis* 6644 АТСС 6633 В-654 и *B. cereus* 37 АТСС 10702 В-1367 у обеих бацилл выражен незначительно, а к *E. coli* 6645 АТСС 25922 В-655 антагонистический эффект проявил только *B. toyonensis* В-13249;

б) штаммы *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 чувствительны к 5 антибиотикам: олеандомицин, энрофлоксацин, мономицин, цефалексин, бензилпенициллин и не чувствительны к оксацилину;

в) выявлено накопление метаболитов белковой природы у обоих штаммов: *B. pumilus* В-13250 в нативном растворе содержит как минимум 3 хорошо видимых белка, размером ~ 22, ~34 и ~57 кДа, *B. toyonensis* В-13249 накапливает хорошо различимые белки размером ~ 36 и ~ 50 кДа. При масс-спектрометрии обнаружен достоверный синтез 117 разнообразных метаболитов у обоих штаммов (из них 43 одинаковых и по 37 уникальных), в том числе аминокислоты, водорастворимые витамины группы В, гормоны, органические кислоты и ряд других.

2. Разработана технология и оптимальные условия производства пробиотического препарата: посевная среда – L-бульон, основная ферментационная – МК-ОС; доза посевного материала – 1%; температура выращивания обоих штаммов – 37 °С; рН – 6,8; время ферментации каждого штамма 24 ч; режим

проточного центрифугирования – 100–130 л/ч при 15000 об./мин; время лиофильной сушки 40 ч; время заморозки в камере сублиматора 8 ч при температуре –35 °С или в морозильной камере – не менее 12 ч при температуре –20–25°С; для стандартизации – 60 мин перемешивания до однородности продукта 98%. Готовый препарат обладает следующими свойствами: светло-кремовый порошок с запахом, характерным для мальтодекстрина, численность бактерий не менее 1×10^{10} КОЕ/г, сохраняющаяся на протяжении 12 месяцев.

3. Препарат обладает высоким профилем безопасности. Однократное введение в дозе 12500 мг/кг (0,25 г/1 мышь) каждой опытной мыши не вызвало гибели ни 1 особи. При ежедневном употреблении внутрь в течение 14 дней дозы 4000 мг/кг (0,08 г/1 мышь) явилось безопасной для жизни лабораторных животных, но при этом незначительно повлияв на интенсивность прироста массы тела.

4. Определена эффективность разработанного пробиотического препарата в промышленных условиях:

а) пробиотический препарат оказывает положительный эффект на выклев цист и выход биомассы *A. franciscana*. Рекомендуемая доза – 0,1 г препарата на 2 г цист;

б) новый пробиотический препарат способствует более раннему выходу из личиночной стадии *M. rosenbergii* по сравнению с контрольной группой (18 и 28 дней соответственно).

5. Пробиотический препарат положительно влияет на восстановление санитарного фона в системе УЗВ. При экспериментально доказанной дозировке – 5 г на 600 литров оборотной воды с добавлением препарата раз в неделю концентрация аммонийного и нитритного азота не превышает пиковых значений.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Используемые в основе пробиотического препарата штаммы рода *Bacillus* могут стать типовыми для практикующих микробиологов и биотехнологов, использоваться в других фундаментальных исследованиях, а также в прикладной аквакультуре и животноводстве, для разработки новых бактериальных препаратов для сельского хозяйства.

2. Разработанный экспериментальный образец препарата «Аквабациллин», рекомендован для добавления в корм ракообразных, обогащения рачков рода *Artemia*, а также добавления в кормовую базу разных представителей аквакультуры с нормой расхода прототипа препарата 0,1 г на 2 г цист артемии, 1 г пробиотического препарата на 100 г цист для кормления *M. rosenbergii*. Для улучшения гидрохимических показателей в УЗВ (расчет на объем воды в 600 л) расход при добавлении 5 г препарата 1 раз в неделю.

3. Лабораторный образец препарата для аквакультур может быть использован в дальнейших исследованиях по изучению его эффективности при использовании в рыбоводстве, а также на объектах животноводства.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* В-13249 и *Bacillus pumilus* В-13250 / А.В. Малкова, И.Ю.

Евдокимов, М.В. Ширманов, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник // Известия вузов. Прикл. хим. и биотехн. – 2021. – Т. 11. – №. 3. – С. 393-402. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>.

2. Оптимизация технологии производства пробиотика на основе споровых бактерий *Bacillus pumilus* b-13250 и *Bacillus toyonensis* b-13249 / **И.Ю. Евдокимов**, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, М.В. Ширманов, Д.Е. Дудник // Вестн. биотехн. и физ.-хим. биол. им. Ю.А. Овчинникова. – 2022. – Т. 18. – №. 3. – С. 20-27.

3. Выбор оптимальной питательной среды для глубинного культивирования природных штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250 / **И.Ю. Евдокимов**, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, М.В. Ширманов, Д.Е. Дудник // Вестн. биотехн. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2023. – Т. 19. – №. 3. – С. 54-63.

Публикации в изданиях, входящих в базы данных Scopus, Web of Science

1. Влияние уровня pH на показатели глубинного культивирования пробиотических штаммов *Bacillus* / **И.Ю. Евдокимов**, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, Д.Е. Дудник, М.В. Ширманов // Ползуновский вестн. – 2023. – №. 1. – С. 29-36. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.004>.

2. Effect of a new probiotic on *Artemia* cysts determined by a convolutional neural network / **I.Yu. Evdokimov**, A.V. Malkova, A.N. Irkitova, M.V. Shirmanov, D.V. Dementev // Foods and Raw Materials. – 2024. – Vol. 12. – №. 1. – С. 91-100. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-1-590>

Статьи в других изданиях

1. Инжиниринговый центр «Промбиотех»: история становления и дальнейшие перспективы развития / **И.Ю. Евдокимов**, А.В. Гребенщикова, М.В. Ширманов, А.Н. Иркитова // Мат. III Междунар. биотехн. симпозиума «Био-Азия Алтай 2021» / отв. за выпуск: О.Н. Мироненко, О.В. Бычкова. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та. – 2021. – С. 16-19.

2. Development of a microbiological preparation for crops based on *Bacillus pumilus* strains / A. Malkova, **I. Evdokimov**, M. Shirmanov, A. Irkitova, D. Dudnik // *FSRAABA 2021*. BIO Web of Conferences. – 2021. – Vol. 36. – 07012. – P. 1-5. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213607012>

3. **Евдокимов, И.Ю.** Определение доли инокулята культур *Bacillus pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249 при глубинном культивировании в ферментационных установках. / **И.Ю. Евдокимов**, А.Н. Иркитова // Актуальная биотехнология. – 2022. – №. 1. – С. 232-235.

4. Подбор оптимальной температуры глубинного культивирования природных штаммов рода *Bacillus* / **И.Ю. Евдокимов**, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, М.В. Ширманов // IX Междунар. конф. молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ. – 2022. – С. 147-148.

5. **Евдокимов, И.Ю.** Разработка инновационных биологических препаратов на основе природных штаммов рода *Bacillus* / **И.Ю. Евдокимов**, А.Н. Иркитова // VIII Пушинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Школа-конф. молодых ученых, аспирантов и студентов

«Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сб. тезисов. М.: ГЕОС. – 2022. – С. 238-240.
<https://doi.org/10.34756/GEOS.2022.17.38387>

6. New bacilli-based probiotic for aquaculture: efficacy study on *Macrobrachium rosenbergii* / A. Malkova, **I. Evdokimov**, M. Shirmanov, A. Irkitova, D. Dementyev // BIO Web of Conferences. – 2022. – №. 42. – 01011.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20224201011>

7. **Евдокимов, И.Ю.** Опыт разработки биологических препаратов для сельского хозяйства ИЦ «Промбиотех» / **И.Ю. Евдокимов**, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова // Аграрная наука – сельскому хозяйству: сб. мат.: в 2 кн. / XVIII Междунар. науч.-практ. конф. (9-10 февраля 2023 г.), приуроченная к 80-летию Алтайского ГАУ. – Барнаул: РИО Алт. гос. аграрн. ун-та. – 2023. – С. 151-153.

Патенты

1. Пат. 2799554 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Новый пробиотический препарат на основе консорциума спорообразующих бактерий для аквакультуры и животных и способ его получения / **И.Ю. Евдокимов**, М.В. Ширманов, А.В. Малкова, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Д.В. Дементьев; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2022108049; заявл. 25.03.22; опубл. 06.07.23, Бюл. № 19. – 8 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПААГ – полиакриламидный гель

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

БАВ – биологические активные вещества

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

ТУ – технические условия

ТИ – технологическая инструкция

КОЕ/г(мл) – колониеобразующие единицы в грамме (миллилитре)

ИЦ – Инжиниринговый центр

Пат. – патент

L – среда Лурия

ГПД – глюкозо-пептонно-дрожжевая среда

ПС – пшеничная среда

МК-БС – меласно-кукурузная бедная среда

МК-ОС – меласно-кукурузная обогащенная среда

НИР – научно-исследовательская работа

КЖ – культуральная жидкость

MRM – Multiple-reaction monitoring (Мониторинг множественных реакций)

ОП – оптическая плотность в фотометрическом режиме при 490 нм

БГКП – бактерии группы кишечной палочки

HR – hatching rate (процент выклева)

CV – Coefficient of variation (коэффициент вариации)