

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Ирkitова Алена Николаевна

Барнаул – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Особенности производства объектов аквакультуры	15
1.2 Биологические препараты, используемые в аквакультуре	20
1.3 Современные тенденции в технологии производства микробных препаратов.....	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1 Объекты исследования	30
2.2 Приготовление питательных сред, реактивов и материалов.....	31
2.3 Методы исследования.....	34
2.3.1 Генетическая идентификация	34
2.3.2 Микробиологические методы исследования	34
2.3.3 Определение содержания биологически активных веществ в культуральной жидкости	36
2.3.3.1 Методика проведения электрофореза в ПААГ	36
2.3.3.2 Методика проведения анализа метаболитов ВЭЖХ-МС/МС	37
2.4 Технология культивирования в биореакторах	39
2.4.1 Подготовка биореакторов к работе	39
2.4.2 Подготовка посевного материала для биореактора.....	40
2.4.3 Ферментация в 15 л биореакторе.....	40
2.4.4 Ферментация в 250 л биореакторе.....	42
2.4.5 Концентрирование, лиофилизация, смешивание, фасовка.....	42
2.5 Исследование токсичности полученного препарата на мышах	43
2.5.1 Исследование острой токсичности.....	43
2.5.2 Исследование хронической токсичности	44
2.6 Проведение промышленных испытаний	44
2.6.1 Инкубирование цист <i>A. franciscana</i>	44

2.6.2 Испытание пробиотического препарата на креветках <i>M. rosenbergii</i>	46
2.6.3 Анализ воды в установках замкнутого водоснабжения.....	47
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	48
3.1 Потенциал исследуемых штаммов	48
3.1.1 Генетическая идентификация	48
3.1.2 Антагонистическая активность	48
3.1.3 Антибиотикорезистентность штаммов	50
3.1.4 Продукция метаболитов <i>B. pumilus</i> В-13250 и <i>B. toyonensis</i> В-13249	52
3.1.4.1 Оценка накопления белков методом электрофореза белков в ПААГ	52
3.1.4.2 Оценка накопления метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС.....	55
3.2 Разработка технологии производства пробиотического препарата для аквакультур	60
3.2.1 Определение оптимальных условий глубинного культивирования штаммов <i>B. pumilus</i> В-13250 и <i>B. toyonensis</i> В-13249	60
3.2.1.1 Подбор питательных сред	60
3.2.1.2 Подбор дозы инокулята.....	67
3.2.1.3 Подбор температуры культивирования.....	70
3.2.1.4 Подбор pH культивирования	73
3.2.1.5 Подбор времени культивирования	76
3.2.2 Разработка технологии получения готовой формы препарата	79
3.2.2.1 Концентрирование культуральной жидкости	80
3.2.2.2 Высушивание концентрированной биомассы.....	81
3.2.2.3 Совместное культивирование <i>B. pumilus</i> В-13250 и <i>B. toyonensis</i> В- 13249.....	85
3.2.2.4 Разработка метода стандартизации препарата.....	88
3.3 Характеристика полученного пробиотического препарата для аквакультур	89
3.3.1 Учет общей численности живых клеток <i>B. pumilus</i> В-13250, <i>B. toyonensis</i> В-13249 в готовом препарате и его микроскопический контроль	91
3.3.2 Установление сроков годности готового препарата	92
3.4 Испытания токсичности готового пробиотического препарата на лабораторных мышах.....	93
3.4.1 Острая токсичность.....	93

3.4.2 Хроническая токсичность	95
3.5 Промышленные испытания пробиотического препарата на объектах аквакультуры	96
3.5.1 Испытание препарата на рачках артемии.....	96
3.5.2 Испытания на креветках Розенберга.....	99
3.5.3 Влияние пробиотического препарата на гидрохимию воды в установках замкнутого водоснабжения	100
ВЫВОДЫ	102
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105
ПРИЛОЖЕНИЯ	141

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ 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
- БГКП – бактерии группы кишечной палочки
- HR – hatching rate (процент выклева)
- CV – Coefficient of variation (коэффициент вариации)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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 и др. [1–3]. Среди самых перспективных отраслей аквакультуры можно выделить креветочную, продукция которой превышает миллионы тонн в год [4].

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*.

Удобство работы с артемией обусловлено её способностью, в неблагоприятных условиях размножаться при помощи цист – анабиотических яиц, способных к долговременному (до 14 лет) хранению и перевозке, с сохранением жизнеспособности. При необходимости биохимические процессы в цистах легко запускаются и в течение 24 часов возможно получить микроскопических (0,3–0,35

мм) подвижных науплиусов, представляющих из себя идеальный корм для личинок креветок [5].

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 рр. *Vibrio* [6], *Salmonella*, *Escherichia* [7, 8] 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 [9–11].

Оздоровливающие свойства пробиотиков заключаются в антагонизме к патогенным микроорганизмам 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 микрофлоры. 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 (Суб-ПРО™, Бацелл-М™, Субтилил™ и т.д.). Современным вектором развития в технологии производства биопрепаратов является снижение себестоимости производства за счет использования в качестве субстратов вторичных ресурсов переработки растительного сырья, которое может стать как основным

компонентом сред для культивирования, так и наполнителем готового продукта. Использование в качестве компонентов сред побочных ресурсов промышленного производства (меласса, кукурузный экстракт и др.) способствует решению экономических 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 *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 и оценить его эффективность.

Задачи исследования:

1. Изучить комплекс культурально-биохимических свойств штаммов *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-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 *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-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 работы

1. В работе впервые описано проявление антагонизма штаммов *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-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 *B. pumilus* В-13250 и *B. 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, pH, времени ферментации каждого штамма, режима проточного центрифугирования, времени лиофильной сушки, заморозки, перемешивания 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.

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 аквакультуры.

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 представленной работе, может представлять 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%, pH 6,8, температура – 37 °C, уровень растворенного кислорода – 50%, длительность ферментации – 24 ч); условия заморозки и времени промораживания (в камере сублиматора 8 ч при –35 °C или в морозильной камере – не менее 12 ч при –20–25°C); 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* B-13250 и *B. toyonensis* B-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* B-13250 и *B. toyonensis* B-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.

Методология и методы исследования

Микробиологические лабораторные исследования, культивирование микроорганизмов *B. pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249 проводили общепринятыми в промышленной микробиологии методами. Масштабирование процессов культивирования производились в опытно-промышленных биореакторах объемом 15 и 250 л периодического действия. Концентрирование, сушка, стандартизация и фасовка пробиотика проводились общепринятыми методами биотехнологических производств, адаптированными под конкретный

новый биопродукт. В работе использованы современные общенаучные и модифицированные специализированные методы, включая методы молекулярной биологии и физико-химического анализа.

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).

Достоверность

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.

Апробация результатов

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 Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», г. Пущино, 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.

Публикации

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.

Лабораторная работа по полному циклу создания пробиотика выполнена на площадях лабораторного комплекса ИЦ «Промбиотех» АлтГУ, г. Барнаул (Алтайский край). Промышленные испытания проведены на площадях промышленного партнера ООО «Арсал», г. Яровое (Алтайский край), а также на производственной креветочной ферме в г. Караганда (респ. Казахстан), под руководством директора по развитию ООО «Арсал», канд. с.-х. наук Д. В. Дементьева. Работы по исследованию токсичности проведены в лаборатории ветеринарии ФГБНУ ФАНЦА под руководством канд. с.-х. наук И. А. Пушкарева. Оценка накопления метаболитов методом электрофореза в ПААГ произведена в РАПРЦ ФГБОУ ВО АлтГУ, под руководством м.н.с. В. Ю. Чирковой; методом ВЭЖХ-МС/МС в лаборатории молекулярной патологии ИМПЗ ФГАОУ ВО НГУ, под руководством канд. хим. наук А. Д. Рогачева.

Благодарности

Автор выражает глубокую, искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н., в.н.с., и.о. директора ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайского государственного университета», Иркитовой А.Н., за научно-методическое руководство, помощь в выполнении и оформлении диссертационного исследования. А также огромная благодарность всему коллективу инжинирингового центра: м.н.с. Малковой А.В., м.н.с. Ширманову М.В., лаборантам Дудник Д.Е. и Кожевниковой Е.Н., за помощь в проведении экспериментов. Благодарность за ценные советы и методическую помощь

сотрудникам РАПРЦ АлтГУ: к.х.н., в.н.с. Коловосу П.В., м.н.с. Колосовой Е.А., м.н.с. Чирковой В.Ю. За консультации и поддержку автор выражает искреннюю благодарность к.б.н., в.н.с. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Щербакову Д.Н.

Структура и объём диссертации

Работа изложена на 150 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждений, выводов, рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности производства объектов аквакультуры

Согласно данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций, в 2016 году объём мирового производства продукции аквакультуры, включая рыбу, ракообразных, моллюсков и других водных животных (исключая водных млекопитающих и рептилий) достиг 171 млн. тонн. При этом две трети общей стоимости продукции (около 64% или 232 млрд. долл. США) пришлось на аквакультуры не включая рыболовство. В то время как объём производства продукции рыболовства в течение нескольких десятилетий оставался более или менее неизменным, производство остальной аквакультуры продолжало расти, причём темпы роста этого сектора показывают гораздо более серьёзную динамику, чем другие основные сектора производства продуктов питания (среднегодовой прирост составил 5,8% в период 2000–2016 гг.) [12]. Прирост мирового производства продукции аквакультуры в значительной мере обеспечивается за счет увеличения объёмов производства креветочной аквакультуры: по прогнозам FAO UN в 2027 году объём производства этого субсектора впервые превысит 100 млн тонн. Ожидается, что в 2030 году производство продукции аквакультуры вырастет до 106 млн тонн (на 22%, или почти на 19 млн. тонн) по сравнению с 2020 годом [13].

Разведение водных животных широко распространено в прибрежных странах, таких как Индия, Тайланд, Мексика и др. [1–3]. Промышленное разведение и выращивание водных животных (беспозвоночных и рыб) в крупных масштабах сопровождается распространением различных инфекций, приводящих к массовой гибели этих животных. К распространённым болезнетворным микроорганизмам в водной среде относятся представители родов *Vibrio* [6], *Salmonella*, *Escherichia* [7, 8] и др. Для предотвращения крупных потерь при воспроизводстве промысловых объектов долгие годы применялись антибиотики, что привело к развитию резистентности к ним у большого числа представителей

микрофлоры [9, 14–28]. Чтобы устойчивость бактерий к антибиотикам не привела к экологической катастрофе, необходим поиск более безопасных способов борьбы с микробами [29–32].

Еще одна проблема, с которой сталкиваются производители аквакультуры – ненасыщенность кормов при производстве в искусственных условиях. Ученые многих стран постоянно проводят работы по совершенствованию рецептур рыбных кормов, поиску новых ингредиентов и ферментных композиций, увеличивающих прирост и снижающих кормовые затраты, и, как следствие, повышающих рентабельность рыбоводства [33–48]. Кроме того, промышленное культивирование креветок имеет свои особенности [4]: на определенных ранних стадиях развития (от нескольких дней до 3–5 недель) молодь, т.н. предличинка, всех промышленно-культивируемых видов, нуждается в подвижности корма. Активное питание, а соответственно 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 (*P. monodon*), но и личинок популярных всеядных видов, таких как белоногая креветка (*P. vannamei* Boone) и креветка Розенберга (*M. rosenbergii*). В связи с этим, еще в 80-е годы XX в. в качестве оптимального стартового корма их личинок стали использовать планктонных галофильных рачков рода *Artemia*, широко распространенных в соленых озерах Западной Сибири [49, 50].

Перспективным направлением для преодоления перечисленных проблем является разработка и применение современных пробиотических препаратов при производстве аквакультуры [9, 11]. Так, исследованиями иранских ученых, было установлено, что у креветок, при выращивании которых применялись пробиотические препараты на основе бацилл (пробиотик добавлялся непосредственно в воду, либо же выдавался с ракообразными рода *Artemia*), наблюдался повышенный в сравнении с контролем уровень выживаемости, а также более эффективное усвоение пищи за счет продукции микроорганизмами различных ферментов [51]. Помимо этого, стоит отметить, что темпы роста и

выживаемость животных не особо различались при кормлении их биопрепаратами или при их добавлении в воду [52]. Ahmadifard и др. проведена работа по оценке воздействия обогащения рачков артемии пробиотической добавкой на основе *Bacillus subtilis* на показатели роста, воспроизводства, микрофлоры и устойчивости к *Aeromonas hydrophila* для декоративных рыб *Poecilia latipinna*. Ими описано, что обогащение артемии положительно сказывается на параметрах испытываемой группы рыб. Также было установлено, что значительных отличий в онтогенезе обогащенной и необогащенной групп артемии нет [10].

Корейские исследователи [53] установили, что штаммы *B. subtilis* KA1 и *B. subtilis* KA3 улучшают усвоение пищи креветками *Palaemon paucidens* и способствуют их выживаемости от вирусной инфекции – синдром белого пятна. Ученые из Китая [54] доказали, что пробиотические бактерии *Bacillus coagulans* ATCC 7050 улучшают рост, морфологию кишечника, иммунный ответ, а также устойчивость к *Vibrio parahaemolyticus* у креветок *Litopenaeus vannamei*. Fernandes et al. (2019) из Индии выяснили, что бактерии *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и *Pseudomonas sp.* не только безопасны в качестве биологических инокулятов, но еще и способны повышать активность ферментов в кишечнике креветок *Lit. vannamei*, за счет чего у беспозвоночных отмечался более высокий прирост массы тела [55]. Тайландские исследователи [4] установили, что *Bacillus aryabhatai* TBRC8450 не только антагонистически активна в отношении таких креветочных патогенов, как *Vibrio harveyi* и *V. parahaemolyticus*, но еще и способствует повышению антиоксидантной активности в плазме животных.

Wang и его коллеги с острова Тайвань экспериментально подтвердили, что многокомпонентная пробиотическая добавка, состоящая из штаммов *Lactobacillus pentosus* BD6, *Lac. fermentum* LW2, *B. subtilis* E20 и *Saccharomyces cerevisiae* P13, эффективнее улучшает состояние здоровья и производительность креветок, чем монокомпонентные препараты, содержащие те же штаммы микроорганизмов [56]. Группа индийских ученых провела работу по обогащению артемии пробиотической добавкой на основе *Lactobacillus sporogenes* с разными концентрациями для дальнейшего вскармливания пресноводным креветкам *M.*

rosenbergii. В результате, после обогащения подвижного корма (рачков артемии) у креветок *M. rosenbergii* наблюдалась лучшая выживаемость, быстрый рост и большее содержание в организме белка, аминокислот, углеводов, липидов. Также ими доказано, что концентрация *Lac. sporogenes* 6×10^8 КОЕ/г явилась оптимальной для использования данных микроорганизмов в обогащении корма [57]. Испанскими учеными проведен эксперимент по введению пробиотика на основе *Lactobacillus rhamnosus* в среду к *Artemia metanauplii*, чтобы проанализировать эффект от применения пробиотика в качестве средства борьбы с потенциально патогенными представителями микроорганизмов семейства *Vibrionaceae*. В результате показано позитивное влияние на рачков *Lac. rhamnosus* и снижение уровня болезнетворных организмов на целый порядок по сравнению с контролем [58]. Аналогичное исследование провели ученые из Индии [59]. Они изучали воздействие пробиотической добавки на основе *Sac. boulardii* на болезнетворный микроорганизм. Выявлено, что науплиусы артемии, обогащенные дрожжами, после их искусственного заражения представителями *Vibrio* имеют улучшенную устойчивость к инфицированию. Другим индийским коллективом проведены исследования по обогащению науплиусов *Artemia parthenogenetica* разными микроорганизмами: *Lac. rhamnosus*, *B. coagulans*. В ходе эксперимента изучалась нагрузка на кишечник и время задерживания в кишечнике науплиусов артемии пробиотических добавок. В результате учеными выявлено, что науплиусы артемии, обогащенные *Lac. rhamnosus*, достигали наполненного состояния кишечника через 39 ($\pm 1,41$) мин., а обогащенные науплиусы *B. coagulans* – через 39,5 ($\pm 0,71$) мин. [60].

Таким образом, в составе пробиотических препаратов для аквакультуры чаще всего применяют хорошо изученные виды родов *Lactobacillus* и *Bacillus*. Однако, для устойчивого развития аквакультуры необходимо увеличить пул микроорганизмов, используемых в качестве пробиотиков для гидробионтов, а также расширить линейку поликомпонентных препаратов на основе микробов-антагонистов к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, в том числе за счет

споровых бактерий [61–65]. Перспективными видами среди бацилл являются *Bacillus pumilus* [66] и *B. toyonensis* [67].

Бактерии *B. pumilus* широко распространены в почве [68, 69], морской и пресной воде [70], бумаге и картоне, на коже человека и теплокровных животных [71], в тканях растений [72–74] и насекомых [71], в колбасных изделиях [73, 75], хлебе [76], молоке [73], какао-порошке [76]. Экспериментально выявлена сильная антагонистическая активность данного микроорганизма по отношению к *Arthrobacter cummingsii* и *Staphylococcus aureus*, ингибирующая активность к *Pseudomonas aeruginosa* [77]. *B. pumilus* продуцирует большое количество ферментов [78, 88], широкий спектр противомикробных антибиотических соединений: амикумацин А [79, 80], пумициллин [81, 82], не пептидный антибиотик против *Alternaria brassicicola* [83]; биосурфактанты: сурфактин, фенгуцин, итурин, плипластин и др. [84–87], рибонуклеазы [89], гидролазы [90], дегидрогеназы [91], сериновые протеиназы [92], субтилизиноподобные протеиназы [93], глутамил-эндопептидазы [94], металлопротеиназы [95], целлюлазы и гемицеллюлазы [96], фосфогидролазы [97], витамины: Р и группы В [98], соединения гуанидинового ряда [99], белковые соединения [100–103]. Антимикробные свойства *B. pumilus* также обусловлены образованием специфических метаболитов и бактериолитических ферментов [104–109]. Изучение свойств штаммов *B. pumilus* актуально и в настоящее время, исследования ведутся как российскими учеными [79, 80, 110–116], так и зарубежными [63, 117–122].

B. toyonensis – это интересный вид бацилл, мало известный в России, но хорошо зарекомендовавший себя в других странах. В русскоязычной литературе фактически не описаны бактерии *B. toyonensis* и в России нет пробиотических препаратов на основе данного микроорганизма. По работам зарубежных авторов известно, что первоначально данный микроорганизм считали подвидом *Bacillus cereus* и называли *B. cereus* var. *toyoi*. Выделенный в конце 60-х годов штамм ВСТ-7112Т с 1975 года после одобрения Министерством сельского и лесного хозяйств Японии входит в состав пробиотика Тоуосерин. В 1994 году данный препарат был

одобрен в Европе, и таким образом штамм ВСТ-7112Т стал первым микроорганизмом, разрешенным в качестве кормовой добавки в Европейском союзе. И лишь в 2013 году после полифазного таксономического исследования было установлено, что штамм ВСТ-7112Т является отдельным видом, получившим название *B. toyonensis* [123].

Как и другие бациллы, *B. toyonensis* является грамположительной спорообразующей бактерией, обитающей в пресных и соленых водоемах [124], а также в подземных водах [125], почве [126] и ризосфере растений [127, 128], кишечнике насекомых [129] и пр. *B. toyonensis* обладает высокой биологической активностью и продуцирует различные вещества: антибиотические и антифунгальные соединения (лактококцин, турицин, пенинодин, бациллибактин, петробактин, хитиназа, холин-подобный пептид BhlA и др.) [130]; ферменты (каталаза, оксидаза, липаза, целлюлаза, хитиназа, лизиндекарбоксилаза, аргининдигидролаза, амилаза, желатиназа, казеиназа, нитратредуктаза); аминокислоты (глицин, аланин, аргинин, цистеин, валин, триптофан, пролин, метионин и др.); витамины (тиамин, пиридоксин, пантотеновая кислота, фолиевая кислота, кобамид, флаavin и др. (BioCyc Database Collection)). Работы по изучению биологической активности штаммов *B. toyonensis* описаны во многих современных исследованиях [61, 128, 131–148].

Ввиду вышеперечисленных свойств и *B. pumilus*, и *B. toyonensis* – перспективны для включения в состав пробиотического препарата для аквакультур.

1.2 Биологические препараты, используемые в аквакультуре

При работе с объектами аквакультуры, все чаще, ученые приходят к мнению, что инфекции гидробионтов требуют максимального вмешательства производителей, так как огромная доля производимой продукции гибнет на ранних этапах развития, а также во взрослом состоянии. Использование антибиотиков вызывает резистентность у патогенных микроорганизмов и вредит

нормофлоре самих объектов аквакультуры, что в целом приводит к распространению различных инфекций внутри предприятия [11, 25, 149–152].

Многие прибрежные и тропические страны, где аквакультура является одним из основных источников пищи, а также сырьевой продукцией на экспорт: Китай, Индия, Вьетнам, Индонезия, Таиланд и некоторые другие, имеют успешный опыт в борьбе с инфекционными заболеваниями водных организмов с помощью микробиологических организмов [11, 153]. Основными объектами аквакультуры в России являются осетр, стерлядь, карп, креветочная аквакультура и некоторые другие [13, 154]. Отечественные предприятия производства аквакультуры также претерпевают проблемы распространения инфекций, массовую гибель, а также уменьшение скорости набора массы из-за неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе плохого санитарного фона. В связи с этим необходимо внедрение в производство аквахозяйств инновационных решений и продуктов для оптимизации производственных техник.

Устименко Е. А. и др. на производствах Камчатки изучали инфекции Тихоокеанских лососей и меры борьбы с ними. Выяснено, что несколько видов бактерий являются особо опасными патогенами лососей: возбудители фурункулеза и бактериальной почечной болезни – *Aeromonas salmonicida* и *Renibacterium salmoicidarum*, а также *Pseudomonas fluorescens*. Также был проведен эксперимент по действию пробиотической добавки «Суб-ПРО» на основе микроорганизмов *B. subtilis*. При добавлении пробиотика в корм сеголеткам кеты обнаружено, что качественный состав микрофлоры кишечника рыб из опытного и контрольного бассейнов в течение всего периода исследований не отличался. При сравнении полученных рыбоводно-биологических показателей отмечено, что введение в корм сеголеток кеты пробиотика «СУБ-ПРО» существенно не повлияло на уровень выживаемости и на изменение массы тела рыб. Данные результаты можно объяснить разницей температурного режима для успешной жизнедеятельности бактерий *B. subtilis* (30 °C) и низкой температурой воды в бассейнах лососевого рыбоводного завода. Следовательно, применение этого препарата на холодноводных рыбозаводах нецелесообразно [155].

Ученые из Новосибирска проводили исследования по применению биологического препарата «Аквапурин» – гомобиотик на основе *Bacillus siamensis* IC 1470-1. Установлено, что применение «Аквапурина» в рыбоводстве способствует повышению интенсивности роста сеголеток и годовиков осетра, улучшает экстерьерные показатели сеголеток и годовиков осетра, стабилизирует биохимические показатели сыворотки крови. Установлено также, что микробиоценоз воды в аквариуме и кишечнике сеголеток и годовиков осетра изменялся в лучшую сторону [156].

Учеными из Астраханской области проведено исследование бактериальных препаратов «ФЕРМ-КМ» на основе микроорганизмов: *Bifidobacterium bifidum* № 791 БАГ, *Bif. longum* ДВА-13, *Bif. bifidum* 8-3, *Lactobacillus casei* Сб, *Lac. acidophilus* КЗШ24, *Lac. plantarum* П-75, а также синбиотика «ПроСтор». В «ПроСтор» входят иммобилизованные на фитосорбенте живые клетки бацилл и их метаболиты: *B. subtilis* (три штамма), *B. licheniformis*, комплекс молочнокислых бактерий. Дополнительно препарат содержит комплекс лекарственных трав (эхинацея пурпурная и расторопша пятнистая). Установлено, что введение препаратов увеличивает интенсивность роста и повышает выживаемость молоди, снижает численность патогенных микроорганизмов в жабрах и кишечнике молоди осетровых рыб, способствует снижению уровня бактериальной обсемененности воды до $2,0 \times 10^3$ КОЕ/мл, а также увеличению обсемененности комбикормов молочнокислыми бактериями до $4,5 \times 10^6$ КОЕ/мл [157].

Ткачева И. В. [158] обосновала использование разных веществ, в том числе и пробиотических препаратов в птицеводстве и прудном рыбоводстве, представив доказательства использования четырех микробных препаратов на объектах аквакультуры:

1. Кормовая пробиотическая добавка «Бацелл-М», из микробной массы *B. subtilis* 945 В-5225 1×10^8 КОЕ/г, *Lactobacillus arcasei* В-2347 1×10^6 КОЕ/г, *Enterococcus faecium* М-3185 В-3491 1×10^7 КОЕ/г, а также вспомогательных веществ – шрота подсолнечного либо продуктов переработки зерновых или бобовых культур (83,95%), мела кормового (10%).

2. «Пролам» – жидкий препарат, из микробной массы *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lac. acidophilus* 43с, *Lac. lactis subsp. lactis* 574, *Lac. lactis subsp. lactis* 1704-5, *Bifidobacterium animalis* 83, воды, молока, мелассы свекловичной.

3. Сухой пробиотик «Моноспорин». Основа – споровая форма *B. subtilis*. В состав препарата так же входят меласса свекловичная, соевый гидролизат, вода.

4. Препарат «СТФ-1/56» представляет собой живую культуру *E. faecium* 1/56.

В результате испытаний выяснено: увеличение дозировок препарата «Пролам» повлияло на интенсивное развитие зоопланктона в опытных прудах. Доказано положительное воздействие кормовой добавки «Бацелл-М» на выживаемость, темп роста и физико-химические свойства карпа. Доказано влияние кормовых добавок «Моноспорин» и «СТФ-1/56» на биологические особенности карпа: активизировалось образование эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов у рыб опытной группы. Результаты паразитологических исследований показали, что в контрольной группе в содержимом задней части кишечника карпа были обнаружены нематоды, гладкие и цилиндрические гельминты (*Capillaria*). Опытная группа рыб была свободна от паразитов за счет устойчивости иммунной системы организма, укрепившейся в ходе применения исследуемых пробиотических добавок. Установлено, что бактерии СТФ-1/56 активно подавляют рост бактерии сальмонеллы, что позволяет расширить сферу применения пробиотиков и использовать препарат «СТФ-1/56» для лечения и профилактики сальмонеллеза у рыб [158].

Исследования Сариева Б. Т. посвящены оптимизации кормления осетровых рыб с использованием пробиотиков на основе молочнокислых микроорганизмов: «лактобифида» (1×10^6 КОЕ в 1 таблетке) и «бифитрилака» (2×10^9 КОЕ в 1 таблетке). В рацион кормления вводился комплекс двух препаратов в соотношении 1:1. При выращивании русского осетра уральской популяции в течение 188 суток в системе замкнутого водоснабжения установлено положительное действие пробиотических препаратов. Лучшие показатели выращивания отмечены в варианте опыта, с добавкой «бифитрилака». Несколько худшие показатели получены при добавлении «лактобактерина». При использовании «лактобифида» и

«бифитрилака» прирост массы был соответственно на 8 и 20% выше, чем в контроле. Также в опытных вариантах отмечали более высокий уровень выживаемости. Рыбоводно-биологические показатели были подтверждены данными состава общих химических веществ и крови. Также исследователями установлен биологический эффект пробиотического препарата «бифитрилак», способствующего увеличению резистентности целевых организмов рыб в условиях повышенного органического загрязнения [159].

Никитиной А. П. из Чувашской республики разработана биогенная кормовая добавка «Akwa-Biot-Norm» на основе дрожжевых клеток *S. cerevisiae*. Доказано, что скармливание «Akwa-Biot-Norm» ленскому осетру не оказывает отрицательного влияния на развитие внутренних органов рыб, способствует повышению прироста живой массы на 5,08–6,21%, активизирует гемопоэз, вызывая положительную динамику изменений морфологических и биохимических показателей, повышается гемоглобин на 8,1–9,9%, а также лейкоцитоз, не превышающий физиологические нормы с ярко выраженным лимфоцитозом на фоне повышения количества нейтрофилов, также выявлено повышение количества общего белка в сыворотке крови на 8,0–9,3%, что свидетельствует об активизации синтетических процессов в организме рыб; активизируются клеточные и гуморальные факторы неспецифической защиты организма в условиях тепловодных хозяйств: бактерицидной активности сыворотки крови – на 10,5–12,6%, фагоцитарной активности нейтрофилов – на 8,4–11,8%, лизоцимной активности плазмы крови – на 6,2–8,5%; добавление в комбикорм биогенной кормовой добавки «Akwa-Biot-Norm» при выращивании ленского осетра повышает их резистентность к заболеваниям (сапролегниоз) в 2,18 раза и их сохранность на 2,6% соответственно [160].

Ряд работ посвящен исследованию применения пробиотика «Субтилин» на основе *B. subtilis* (1×10^6 КОЕ/г) и *B. licheniformis* (1×10^6 КОЕ/г): молоди осетров [161], молоди стерляди [162, 163], клариевого сома (*Clarias gariepinus*) [164], молоди севрюги [165]. Во всех работах отмечен положительный эффект на

интенсивность роста, увеличение массы тела, накопление в тканях протеина, большой уровень гемоглобина и общий объем эритроцитов.

Таким образом, микробные препараты играют значительную роль в улучшении санитарного фона и производственных показателей аквакультур. В настоящее время большую долю пробиотических препаратов для аквакультуры составляют микробные препараты на основе споровых микроорганизмов рода *Bacillus*, что обусловлено их неприхотливостью при культивировании, высокой сохранностью при заморозке, сушке и хранении, продолжительным сроком хранения.

1.3 Современные тенденции в технологии производства микробных препаратов

Технология производства микробных препаратов для аквакультуры сводится к следующим основным этапам:

1. Поиск наиболее перспективных штаммов, обладающих технологически-ценными свойствами по отношению к условиям производства и промышленного разведения аквакультур [166–173].
2. Лабораторные исследования эффективности на предполагаемых объектах аквакультур, определение биологического потенциала новых штаммов [174–177].
3. Оценка биологической активности штаммов по отдельности и в консорциуме, подбор микробной композиции [178–180].
4. Разработка условий культивирования и технологии производства биологических препаратов [181–183].
5. Проведение промышленных испытаний на объектах аквакультуры [10, 51, 54, 58].

При этом в процессе любого производства, в том числе биотехнологического, очень важно повышение экономической эффективности. Экономический эффект при производстве пробиотиков зависит от многих факторов: активность исходных культур по отношению к патогенам, способность культур наращивать высокий титр в производственных условиях, выход биомассы, биосовместимость

микроорганизмов при производстве поликомпонентных продуктов, степень сохранности микроорганизмов в сухих и в жидких формах, условия хранения и др. Основной способ применения пробиотиков в аквакультуре – вскармливание перорально, добавляя пробиотик в воду [184–186], либо добавлением в состав корма [187–192], реже добавлением контактно, непосредственно на сам объект исследований, например, икру осетровых [193] или цисты рачков артемии [194].

В связи с выше перечисленными факторами оптимизация технологий производства современных биологических препаратов постоянно развивается в следующих направлениях:

1. Повышение эффективности культивирования микроорганизмов путем подбора наиболее оптимальных физических и химических параметров. Данные исследования направлены на повышение накопления биомассы микроорганизма или увеличение количества/активности биологически активных веществ за более короткий промежуток времени.

Самсонова А. С. определила оптимальную питательную среду (Мейнелла) и интенсивность аэрации 0,5 л воздуха/л среды/мин для *B. subtilis* 6/2-АПФ1, *Ps. putida* 10 АП, что позволило получить культуральную жидкость с титром $6,0\text{--}7,2 \times 10^9$ КОЕ/мл. [195]. Пискаева А. И. и Просеков А. Ю. использованием мальтозы и триптона в качестве источников углерода и азота добились максимального прироста биомассы *B. pumilus* AL16, *Microbacterium terregens* AC1180, *Aeromonas* sp. B5376, *Arthrobacter globiformis* AC1529, *Streptomyces olivocinereus* AC1169, *Acinetobacter* sp. – деструкторов кератина [196]. Ученые из Китая определили наилучшие условия роста (pH=7,0, 30 °C, 6,7 мг/л растворенного кислорода, дозе посевного материала – 10%) для *Bacillus* sp. [197].

Shafee N. с коллегами получены наилучшие показатели выработки щелочной протеазы в *B. cereus* [198]. Китайские ученые определили условия максимального выхода целлюлазы *B. amyloliquefaciens* [199]. Nguyen H.-Ye. и Tran G.-B. установили оптимальные условия ферментации и параметры среды для производства глюкозоизомеразы *B. megaterium* [200].

2. Выбор наиболее выгодных питательных сред по качеству и количеству компонентов. Данные исследования обеспечивают повышение рентабельности производства за счет малой продолжительности ферментации и низкой себестоимости компонентов.

Китайскими учеными методом ступенчатой подачи питательных веществ, в частности, источников углерода, удалось увеличить количество биомассы культуры *B. subtilis* [201]. Фирсова М. С. с коллегами добилась самого высокого показателя удельной скорости роста и наибольшего накопления биомассы при культивировании на соево-казеиновом бульоне *Avibacterium paragallinarum* [182]. Сираевой З. Ю. с соавторами доказана возможность накопления наибольшего выхода биомассы и увеличения содержания спор (94,6%) при культивировании *Bacillus* на пшенично-кукурузной среде [181]. Группой ученых из Белоруссии определен оптимальный состав среды культивирования *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* [202]. Яценко Е. С. с коллегами из Алтайского государственного университета разработали питательную среду для культивирования *Ps. fluorescens* AP-33, которая отличается от стандартных тем, что содержит горох шлифованный и янтарную кислоту. Использование новой среды позволило: повысить количество *Ps. fluorescens* AP-33 в процессе культивирования до 1×10^{11} КОЕ/мл; сохранить количество клеток в жидкой среде до 45 дней, на твердой – до 6 месяцев [203]. Также, проведены исследования по оптимизации питательной среды для достижения наивысшего титра споровых организмов: добавлением 40%-ного спиртового экстракта кровохлебки лекарственной [204], добавлением сульфата аммония [205], внесением экстракта кофе арабика [206].

Индийскими учеными при производстве фермента ацилазы из *Bacillus* sp. определен состав оптимизированной среды (г/л): K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,1; PAA – 2,0; триптон 5,0; дрожжевой экстракт 3,0; сахароза 50,0, которая позволила получить наилучший выход фермента [207]. Ноа и др. оптимизировали состав ферментационной среды для производства эндотоксина дельта *B. thuringiensis* [208], исследователи из Нигерии достигли выхода метионина 3,18 мг/мл *B. thuringiensis* EC1, используя в качестве источника углерода

мальтозу, дополнительно вносяв рибофлавин, тиамин, и двухвалентные металлы [209]. Tian Y. и др. получили выход ацетина *B. subtilis* SF4-3 – 45,4 г/л при наличии в среде дрожжевого экстракта, кукурузного экстракта и мочевины [210].

Китайскими учеными получена дешевая среда, также добавлением кукурузного экстракта и сахарозы в питательный раствор для производства фибринолитических ферментов *B. subtilis* WR350: 35 г/л сахарозы, 20 г/л кукурузного экстракта и 2 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [211]. Отечественными учеными определен состав среды для повышения бактерициноподобной активности штамма *B. thuringiensis* ssp. *dakota*: пептон – 9 г/л; дрожжевой экстракт – 2,6 г/л; глицерин – 5,6 г/л, на данной среде антимикробная активность повысилась на 60% по сравнению с исходной средой [212].

3. Ускорение получения целевых БАВ (ферментов, аминокислот, витаминов и т.д.) методами генной инженерии.

Данное направление значительно ускоряет селекцию промышленных микроорганизмов. Так, ученые из Германии при получении сурфактина, вырабатываемого *B. subtilis*, использовали мутантный штамм *B. subtilis*, не образующих спор, из-за отсутствия части генов: *spo0A* и *abrB*, что способствовало гораздо большей продукции сурфактина при культивировании по сравнению с лабораторным штаммом 168 (JABs24), количество сурфактина доходило до 26,5 г/л [213]. Группой Сибирских ученых разработан рекомбинантный химозин марала на штамме GG799 дрожжей *Kluyveromyces lactis* с активностью 152 УЕ/мл [214]. Пакистанские ученые занимались повышением продукции эндоглюканазы в *E. coli* BL21 (DE3). Им удалось достичь активности эндоглюканазы – 1185 ЕД/мг [215].

4. Расширение пула штаммов микробов за счет поиска наиболее активных природных микроорганизмов.

Nguyen A. T. et al. выделили и охарактеризовали штамм *B. subtilis* CH16 из желудочно-кишечного тракта цыплят для использования в качестве кормовой добавки для стимулирования увеличения веса у бройлеров [167]. Противосальмонеллезную активность молочнокислых бактерий, выделенных из фекалий крупного рогатого скота, исследовали Индийские ученые,

идентифицировав 88 микроорганизмов, принадлежащих к 15 видам, большинство из которых показали высокую активность против тестируемой *S. enterica* spp. [168]. Поиском пробиотических микроорганизмов занимался коллектив ученых из Кореи и Индии, выделив из содержимого кишечника *Cyprinus carpio* 107 Pb-резистентных штаммов бактерий, из них 7 штаммов с высокой Pb-связывающей активностью, один из них P16 идентифицирован как *Lac. reuteri*, признан для использования от токсичности, вызванной воздействием свинца, в аквакультуре [170]. Ученые из Южной Африки выделили представителей *Bacillus* spp. в качестве пробиотиков для домашней птицы (48 изолятов), отобрали 6 изолятов *B. subtilis* и *B. velezensis*, которые проявили сильный комплексный пробиотический эффект [171]. Исследованием штаммов из подвздошной и слепой кишки кур бройлеров занимались ученые из Франции, выделив 4 вида лактобацилл: *Ligilactobacillus salivarius*, *Limosilactobacillus reuteri*, *L. fermentum* и *Lactobacillus crispatus*. В результате анализов культивирования, полное ингибирование роста сальмонелл было через 24 часа. *Lig. salivarius* обладал потенциалом для использования в качестве профилактического пробиотика, добавляемого в рацион для контроля колонизации *Salmonella* spp. [173]. Maeda M., Liao I. выделили два ризосферных штамма PM-4 и NS-110, при добавлении которых в воду для роста науплий *P. monodon*, вызывало ингибирующее действие на штамм *Vibrio anguillarum*, также к выживанию личинок коловраток (57%) [175, 216]. Мексиканскими учеными выделен штамм *B. toyonensis* COPE52 из ризосферы *Rubus fruticosus* [217] в качестве стимулятора роста *Vaccinium* spp., var. *biloxi*. Подобная работа со штаммом данного вида – первая, подтверждающая ростостимулирующую активность *B. toyonensis* у растений [218–220].

Таким образом повышение экономической эффективности при производстве пробиотиков для аквакультуры может быть достигнуто различными способами без потери качества готового продукта.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Штаммы бактерий. В качестве объектов исследования для разработки пробиотического препарата в работе использованы 2 штамма споровых бактерий из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ (таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы бацилл, использованные для проведения исследования

Штамм	Источник выделения	Регистрационный номер (ВКПМ)	Морфология
<i>B. toyonensis</i>	Ризосфера р. <i>Helianthus</i>	В-13249	Палочки (около 1 мкм), чаще расположенные парами или цепочками. Колонии на L-среде грязно-белого цвета, 1,0–1,2 см, блестящие, приподнятые, с неровным краем.
<i>B. pumilus</i>	Ризосфера р. <i>Cichorium</i>	В-13250	Палочки (около 0,7 мкм), чаще расположенные одиночно или парами. Колонии на L-среде белого цвета, с максимальным диаметром 0,5–0,8 см, матовые, приподнятые, ровной округлой формы, со складчатой каймой.

Оба штамма образуют овальные споры, расположенные терминально или субтерминально, выдерживают нагревание в 80 °С в течение 30 минут (рисунок 1).

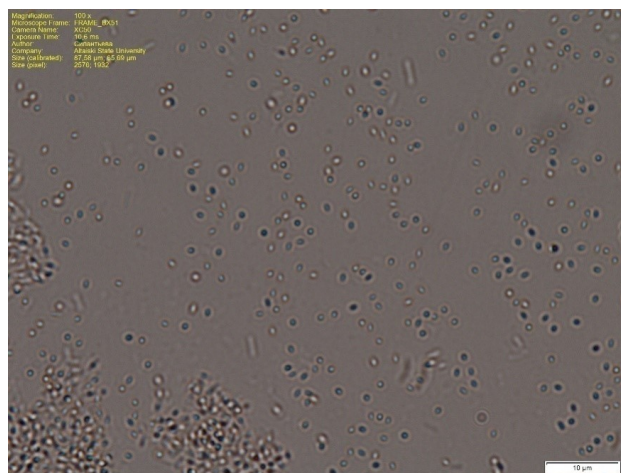


Рисунок 1 – Препарат «раздавленная капля», споры ризосферных штаммов *Bacillus sp.*, ×1000

Внешний вид колоний представлен на рисунке 2. Для у *B. toyonensis* В-13249 характерны колонии мутно-бежевого цвета, с максимальным диаметром 0,9–1,1 см, блестящие, приподнятые, с неровным краем. На L(Лурия)-твердой среде: колонии грязно-белого цвета, 1,0–1,2 см, блестящие, приподнятые, с неровным краем. Колониям *B. pumilus* В-13250 присущи колонии желтоватого цвета на МПА, с

максимальным диаметром 0,5–0,7 см, матовые, приподнятые, ровной округлой формы, со складчатой каймой. На L-твердой среде культура образует колонии белого цвета, с максимальным диаметром 0,5–0,8 см, матовые, приподнятые, ровной округлой формы, со складчатой каймой. Цвет колоний на окраине более прозрачный по сравнению с центром.

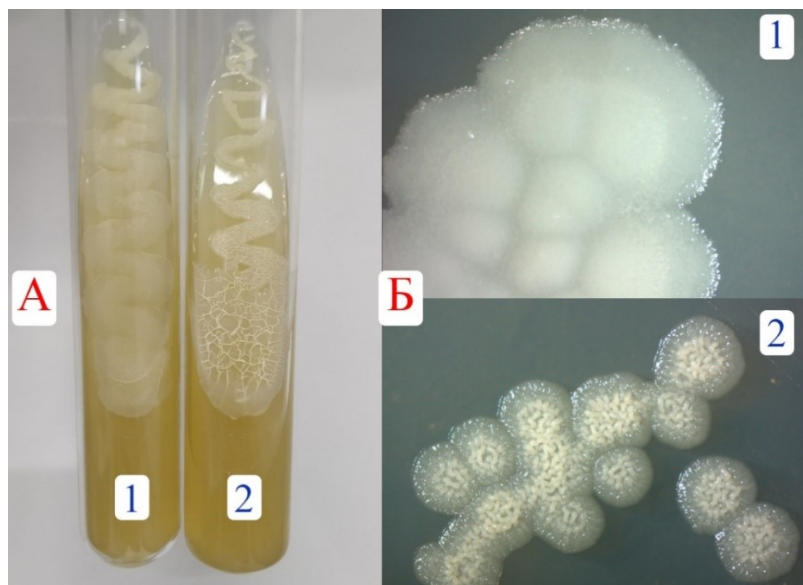


Рисунок 2 – Внешний вид ризосферных штаммов бацилл: А – чистые культуры на скошенном агаре, Б – колонии на L-агаре, $\times 10$. 1 – штамм *B. toyonensis* В-13249; 2 – штамм *B. pumilus* В-13250

Объекты аквакультуры. В качестве объектов исследования для проведения промышленных испытаний использовали цисты жаброногого рачка артемии *A. franciscana* двух партий ООО «Арсала»: Z29.04 (озеро Большое Яровое) и С9 (озеро Кучукское). Испытания по проценту выклева и выходу биомассы артемий проводились на базе лаборатории ООО «Арсал», г. Яровое (Алтайский край, РФ) [221] (приложение 1).

Еще один объект для промышленных испытаний – пресноводные креветки Розенберга. Испытания проводили на частной ферме, расположенной в Республике Казахстан, в окрестностях г. Караганда. Для эксперимента использовали потомство самки *M. rosenbergii*, разделенное на 2 группы: контрольную и опытную [194].

2.2 Приготовление питательных сред, реактивов и материалов

Мойку, дезинфекцию, стерилизацию лабораторной посуды, а также подготовку помещений (стен, потолков, пола) к работе проводили согласно стандартам, принятым в Российской Федерации [222–226].

Для восстановления культур, посева на твердый субстрат, контроля численности и чистоты использовались питательные среды и реактивы:

Физиологический раствор: 8,5 г NaCl растворяли в 1 л дистиллированной воды, разливали в пробирки по 10 мл, закрывали ватно-марлевыми пробками и стерилизовали при 121 С° в течение 10 минут.

Питательные среды готовили в эмалированной или стеклянной посуде. Готовые питательные среды хранились, при комнатной температуре не более 3 суток и при температуре около 4 °С не более одного месяца [227].

L(Лурия)-среда (г/л): дрожжевой экстракт – 5,0, пептон – 15,0, NaCl – 5,0, агар – 15,0, вода дистиллированная – 1,0 л. Среду тщательно размешивали, доводили до кипения, разливали в колбы или пробирки, закрывали ватными пробками и стерилизовали при температуре 121 (±2) С° в течение 15 (±1) минут [228].

Для приготовления жидкого *L-бульона* использовался этот же рецепт, только без добавления агара.

Среда Эндо (г/л): 37 г сухой среды вносилось в 1000 (±50) мл холодной воды. Смесь тщательно перемешивали, кипятили 3–5 мин, не допуская пригорания, и фильтровали через ватно–марлевый фильтр (при наличии осадка). Готовую среду разливали в колбы, закрывали ватными пробками и стерилизовали при температуре 121 (±2) С° в течение 15 (±1) мин. Перед применением колбу со средой растапливали на водяной бане и разливали по чашкам [229]. Эту среду используют для проверки наличия в пробах бактерий группы кишечной палочки.

Сухой питательный агар (г/л): 45 г сухой среды растворяли в 1000 мл воды. Смесь тщательно перемешивали, доводили до кипения и кипятили 3–5 мин, не допуская пригорания. После розлива автоклавировали.

Среда Левина (г/л): 37,5 г порошка размешивалось в 1000 мл дистиллированной воды. Прокипятили для полного растворения частиц и

автоклавировали. Среда хранилась в темноте, чтобы не допустить ее окисления на свету [230].

При глубинном культивировании микроорганизмов в биореакторах использовались среды и реактивы [231]:

Глюкозо-пептонно-дрожжевая (ГПД [183] (г/л): глюкоза – 15; пептон – 3; дрожжевой экстракт – 5; K_2HPO_4 – 4; NaH_2PO_4 – 1; NaCl – 1; $CaCl_2$ – 1; $MgSO_4$ – 0,25; $MnSO_4$ – 0,03; $FeSO_4$ – 0,01; лапрол – 2 мл/л; дистиллированная вода – до 1 л (доводился pH=6,8–7,2).

Пшеничная среда (ПС [181] (г/л): отруби пшеничные – 40; $MgSO_4$ – 0,9; KH_2PO_4 – 0,5; $CaCO_3$ – 1; лапрол – 0,25 мл/л; дистиллированная вода – до 1 л. Предварительно отруби разваривали в небольшом содержании воды, в течении 1,5–2 ч, после чего процеживали, отделяли от крупных нерастворимых остатков, для избежания оседания на внутренних составных частях ферментера, а также закупоривания мембранных клапанов.

Меласно-кукурузная бедная среда (МК-БС, собственная разработка) (г/л): меласса – 25; кукурузный экстракт – 12,5; $MgSO_4$ – 0,9; KH_2PO_4 – 0,5; $CaCO_3$ – 1; лапрол – 0,25 мл/л; дистиллированная вода – до 1 л.

Меласно-кукурузная обогащенная среда (МК-ОС [232], доработанная (г/л)): меласса – 25; дрожжевой экстракт – 1; триптон/пептон – 0,5; кукурузный экстракт – 12,5; $MgSO_4$ – 0,25; $MnSO_4$ – 0,03; $CaCl_2$ – 1; $CoCl_2$ – 0,046; $FeSO_4$ и $CuSO_4$ – по 0,1 г; лапрол – 2 мл/л; дистиллированная вода – до 1 л.

Защитная (криопротекторная) среда: (г/л): желатин – 25, сахароза – 100, дистиллированная вода до 1 л [233].

20%-ный раствор NaOH: для поддержания водородного показателя pH (80 г сухого NaOH доводили водой до метки в цилиндре). Большие объемы щелочи (для ферментации в ферментере 250 л) готовили заранее в специализированной емкости для щелочи с перемешивающим устройством, из нержавеющей стали.

В качестве химического пеногасителя использовали лапрол.

Все перечисленные среды и реактивы, а также колбы с дистиллированной водой стерилизовали в автоклаве при 1 атмосфере в течение 30 минут, за

исключением сред, готовящихся непосредственно в ферментерах. После стерилизации, среды выдерживали в термостате при температуре 30 °С в течение 24 часов для подтверждения микробиологической чистоты [234].

Колбу для посевного материала объемом 1 л с зажимом, колбы для отбора проб, емкости для центрифугирования, контейнеры/лотки для лиофилизации и другие расходные материалы стерилизовали в сухожаровом шкафу в течение 3 часов при 160 °С [183].

2.3 Методы исследования

2.3.1 Генетическая идентификация

Принадлежность штаммов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 к соответствующим видам подтверждали генетически на базе Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовского института» – ГосНИИГенетика в 2018 году, на основе проведения секвенирования переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК обоих штаммов, а затем видоспецифических праймеров: для *B. toyonensis* В-13249 – праймеры *Bacillus cereus* group (BTf и BTr; BAf и BAr; BCf и BCr); для *B. pumilus* В-13250 – Pum-f и Pum-r, Saf-f и Saf-r (приложение 2).

2.3.2 Микробиологические методы исследования

Техника посева на твердые питательные среды. Посев на твердые питательные среды проводили чашечным методом Коха [235] с применением десятикратных разведений [236].

Микроскопия. Чистоту культур на каждом этапе контролировали методом микроскопирования. При этом готовили фиксированный окрашенный препарат, окрашивали пробы по Граму, готовили препарат «раздавленную каплю» [237].

Условия культивирования и учет численности микроорганизмов. Пробы с *Bacillus sp.* в жидких питательных средах инкубировали в шейкер-инкубаторе

«Innova 44» («New Brunswick», США) при вращении 250 об./мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37 °С в течение 24 часов.

Пробы с *Bacillus sp.* на агаризованных питательных средах инкубировали в термостате «Binder BD 115» при 37 °С в течение 24 часов.

После инкубирования посевов подсчитывали количество колоний, выросших на чашках Петри. Для подсчета отбирали чашки Петри, на которых выросло от 15 до 300 колоний. Подсчет колоний на чашках производили с помощью счетчика колоний «Scan 100» («Interscience», Франция).

Учет численности микроорганизмов в пробе вели по следующей формуле:

$$X = N \times P \div V, \quad (1)$$

где N – среднеарифметическое число выросших колоний;

V – объем разведения, использованного для проведения испытания, мл;

P – выбранное разведение.

За окончательный результат испытания принимали среднее арифметическое значение параллельных определений, допускаемое расхождение, между которыми не превышало 10% относительных.

Рост бактерий на жидких питательных средах отмечали как положительные пробы в пробирках (или колбах), в которых наблюдали помутнение среды, образование осадка [238, 239].

Антагонистическую активность исследуемых культур производили диффузионным методом отсроченного антагонизма (перпендикулярных штрихов) при совместном высеве с патогенными тест-культурами на агаризованные среды [240]. В качестве штаммов-антагонистов использовали *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, в качестве тест-культур патогенные и условно-патогенные штаммы (10 тест-культур) из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [241].

Штаммы-антагонисты наносили бактериологической петлей штрихом на чашку с питательным агаром и культивировали в термостатированных условиях в течение 48 часов, после чего к выросшему штриху перпендикулярно подсеивали тест-культуры. Посевы культивировали в течение 24–48 часов при температуре 37

°С. Положительный результат по определению антимикробной активности исследуемых бактерий учитывали по наличию лизиса или угнетения роста патогенов в зоне диффузии выделяемых ими в среду метаболитов.

Антибиотикорезистентность исследуемых штаммов определяли диско-диффузионным методом на твердой L-среде. Для этого на поверхность агара сплошным газоном рассеивали культуру бацилл. На среду помещали диски с различными антибиотиками. Учет проводили по зонам отсутствия или подавления роста бактерий вокруг дисков с антибиотиками [242, 243].

2.3.3 Определение содержания биологически активных веществ в культуральной жидкости

Для проведения оценки накопления метаболитов белковой природы оба исследуемых штамма выращивали сначала в качалочных колбах на L-среде (24 ч), а затем в ферментере объемом 250 л на МК-ОС (24 ч). После чего отнимали аликвоты КЖ, центрифугировали, концентрировали. Концентрирование КЖ производили на установке ультрафильтрации УПВ-3 с разделителем АР-3-15 (ООО НПК «БиоТест», Россия). Готовые образцы отправляли на карантинное хранение для последующих работ.

Далее проводили электрофоретическое разделение КЖ в ПААГ для определения наличия белков и определяли состав метаболитов культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс детектированием для идентификации соединений в среде роста.

2.3.3.1 Методика проведения электрофореза в ПААГ

Приготовление геля для проведения электрофореза. В работе использовали 2 геля: концентрирующий и разделяющий. Для приготовления разделяющего геля смешивали 1710 мкл воды, 1530 мкл 44% акриламида, 1125 мкл 1,5М Трис-НСl, 114 мкл ПСА (50 мг/мл) и 8 мкл Temed. ПСА и Temed добавляли последними, заливали гель между стеклами. Сверху на гель наслаивали воду и гель оставляли

до полной полимеризации. После окончания полимеризации воду сливали, остатки воды удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Для приготовления концентрирующего геля смешивали 670 мкл воды, 187,5 мкл 30% акриламида, 312,5 мкл 0,5М Трис-НСl, 30 мкл ПСА и 4 мкл Temed. Затем, заливали гель и устанавливали гребенки. После полимеризации гребенки убрали, стекла помещали в электрофоретическую камеру.

Пробоподготовка. По 10 мкл исследуемых образцов смешивали с 10 мкл литической смеси, после чего, образцы инкубировали при 100 °С в течении 5 минут.

Проведение электрофореза. Ячейки со стеклами устанавливали камеру для электрофореза, камеру и ячейки заполняли буферным раствором. Образцы вносили в карманы геля по 15 мкл, для визуальной оценки в один из карманов вносили маркер. Электрофорез проводили в течении 70 минут при 150V. По окончании электрофореза стекла с гелями вынимали и сливали буфер.

Окрашивание геля. Гель отделяли от стекол, помещали в емкость и заливали красителем Кумасси R-250. Окрашивание проводили в течение 40 минут, после чего краситель сливали, а гели заливали дистиллированной водой и кипятили 10 мин для обесцвечивания.

Оценка результатов. После обесцвечивания оценивали наличие дорожек с полосами (бендов) для проб, в которых происходила наработка белка [244].

2.3.3.2 Методика проведения анализа метаболитов ВЭЖХ-МС/МС

Анализ метаболитных профилей *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 производили методом ВЭЖХ-МС/МС в лаборатории молекулярной патологии института медицины и психологии В. Зельмана ФГАОУ ВО «Новосибирского национального исследовательского государственного университета». Для этого использовали КЖ каждого штамма, выращенного согласно разработанному биотехнологическому циклу. Клетки отделяли методом проточного центрифугирования, нативный раствор дополнительно концентрировали в 10 раз на установке ультрафильтрации УПВ-3 с разделителем AP-3-15ПС. Контролем

служила стерильная ферментационная питательная среда из ферментера. Подсчет количества метаболитов вели в 2 повторностях при десятикратном разведении.

Пробы анализировали на хроматографе Shimadzu LC-20AD Prominence («Shimadzu», Япония), оснащённом автодозатором SIL-20AC («Shimadzu», Япония), термостатированном при 10 °С. Для анализа использовали монолитную колонку, представляющую собой сополимер стирола, дивинилбензола и винилтразола. Подвижная фаза А представляла собой водный раствор 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ с добавлением водного аммиака до pH=9.8 и 5% [об./об.] ацетонитрила; элюент представлял собой чистый ацетонитрил. Анализ образцов в режиме гидрофильной хроматографии и обращенно-фазовой хроматографии на указанной колонке с использованием указанных элюентов. Градиент для гидрофильной хроматографии был следующим: 0 мин – 98% элюента Б, 2 мин – 98% Б, 6 мин – 0% Б, 10 мин – 0% В. После чего колонку уравнивали в течение 4 мин. Градиент для анализа в обращенно-фазовом режиме был следующим: 0 мин – 0% Б, 1 мин – 0% Б, 6 мин – 98% Б, 16 мин – 98% Б. Затем колонку уравнивали в течение 3 мин.

Метаболиты ($n = 398$) анализировали в режиме MRM. Сбор данных проводили на масс-спектрометре API 6500 QTRAP («AB SCIEX», США), оснащённом источником ионизации электрораспылением, работающим в режиме переключения «плюс/минус». Основные масс-спектрометрические параметры были следующие: напряжения IS (ионного распыления) были установлены на уровне 5500 В и -4500 В для положительного и отрицательного режимов, соответственно. Температуру ионного источника устанавливали – 475 °С, газ CAD устанавливали в режиме «средний», газ 1, газ 2 и газ завесы были 35, 35 и 30 фунтов на квадратный дюйм соответственно. Потенциал декластеризации составлял ± 93 В, входной потенциал составлял 10 В, выходной потенциал ячейки столкновений – 20 В для положительных и отрицательных ионов. Время переключения (установки) полярности устанавливали – 5 мс, а время задержки – 3 мс для каждого перехода MRM. Управление устройством и сбор информации осуществляли с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.2 («AB SCIEX», США) [245].

Данные MRM обрабатывали в программном обеспечении MultiQuant™ 2.1 («AB SCIEX», США). Ширина сглаживания по Гауссу составляла 1,0 балл, минимальная высота пика составляла 300 имп/с, а полуокно времени удерживания – 30 с. После автоматического интегрирования хроматограммы контролировали визуально, а затем результаты интегрирования экспортировали в электронную таблицу Microsoft Excel. Сравнение образцов проводили путем сравнения сигналов метаболитов (значений площади пиков на хроматограммах) с помощью t-критерия Стьюдента. Для сравнения выбрали 355 метаболитов, имеющих ненулевой сигнал для всех образцов во всех повторностях.

2.4. Технология культивирования в биореакторах

2.4.1 Подготовка биореакторов к работе

Подготовка ферментера к работе включала в себя очистку аппарата от предыдущей загрузки и проверку исправности его составных частей. Ферментер разбирали, тщательно промывали, производили внутренний осмотр аппарата, проверяли работу механического перемешивающего устройства. Затем, ферментер собирали, проводили слесарную подготовку с ревизией исправности запорной арматуры, системы барботера, чистоты и исправности воздушных фильтров. Собранный ферментер проверяли на герметичность.

Затем производили процесс стерилизации и проверки исправности составных элементов как аппарата, так и обвязки: клапана, тэн, вентили, предохранительные клапаны, насос охлаждения, рубашки ферментера, закольные штуцера, проходимость барботера, обороты разноуровневой мешалки.

Стерилизацию ферментера проводили в 2 этапа: стерилизация индивидуального воздушного фильтра и стерилизация среды в аппарате. Ферментации в данной работе проводили в биореакторах 15 л и 250 л (ООО «Сторге», Россия) вместимостью. Стерилизацию аппаратов вели аналогично.

Стерилизацию воздушного фильтра осуществляли острым паром при давлении 1,3–1,5 атм. и температуре 121–127 °С в течение 1 часа. Пар подавали во

все материальные трубопроводы и барботер аппарата через индивидуальный фильтр. Температуру и давление при стерилизации поддерживали подачей пара в аппарат и вентилем выхлопа.

В каждом биореакторе готовили питательную среду рабочим объемом и стерилизовали ее при температуре 121–127 °С и давлении 1,3–1,5 атм. в течении 1 часа путем подачи острого пара первоначально в рубашку аппарата для достижения температуры 113–115 °С, непосредственно в аппарат через барботирующее устройство, сливной патрубков и фитинг отбора проб.

После стерилизации захлаживали аппараты со стерильной средой для контроля стерильности на суточный карантин. После остывания отбирали пробу среды для измерения оптической плотности КЖ, также проверяли pH среды на контрольном стационарном pH-метре для линейной подстройки показаний датчиков на аппаратах [183, 231].

2.4.2 Подготовка посевного материала для биореактора

Материнскую закваску в объеме 1 литр получали из музейных культур, пересевая их петлей в колбы с 200 мл питательной среды. Инокулят инкубировали в шейкер-инкубаторе «Innova 44» при 250 об./мин, температуре 37 °С на протяжении 18–24 часов. По окончании процесса, отбирали пробу для контроля чистоты и численности (микроскопия, рассев на L-среду и Эндо) [246].

Полученную материнскую закваску использовали для посева 15-литрового ферментера. Посев производили посредством закола из предварительно простерилизованной колбы либо с нижним отводом, либо с продетым до дна силиконовым шлангом [183].

2.4.3 Ферментация в 15 л биореакторе

Культивирование бактерий в ходе ферментации представляло собой совокупность последовательных операций от внесения посевного материала в питательную среду до завершения процессов роста и спорообразования, вследствие

исчерпывания питательных веществ среды [247]. Ввиду того, что бациллы являются аэробами, процесс их культивирования в биореакторе был аэробным, а также глубинным, периодическим и динамическим [248]. Культивирование начинали без добавления дополнительного воздуха, для начального роста использовали растворенный кислород в среде после стерилизации.

Перед посевом в ферментере устанавливали автоматический контролируемый режим. Культивирование вели при параметрах: расход воздуха – 0–700 л/мин; давление – 0,2–0,3 атм.; содержание растворенного кислорода в питательной среде – 50%, температура ферментации – 37 °С, pH – 6.8.

Содержимое посевных колб в асептических условиях сливали в стерильную колбу для посева с шлангом для передачи посевного материала в ферментер. Инокуляцию ферментера осуществляли стерильной посевной иглой, соединенной силиконовой трубкой с посевной колбой. Под пламенем горелки осуществляли закол, и посевной материал передавали из рабочей колбы в ферментер. Количество посевного материала составляло около 10% от рабочего объема залитой питательной среды.

После посева ферментера температуру КЖ поддерживали на уровне 37 °С. Перемешивание при 250 об./мин. Концентрацию растворенного кислорода pO_2 поддерживали на уровне 50%. В момент сильного вспенивания допускали повышение давления в аппарате до 1 атм., снижали концентрацию растворенного кислорода pO_2 вплоть до полного временного прекращения подачи воздуха и добавляли химический пеногаситель.

Время ферментации исследуемых бацилл для достижения максимального титра составляло 18–24 часа. Каждые 2–4 часа производили стерильный отбор проб для проведения наблюдений за развитием культуры бактерий, ее морфологическим состоянием и отсутствием посторонней микрофлоры, а также измерения оптической плотности культуральной жидкости. ОП измеряли на спектрофотометре UV-1280 («Shimadzu», Япония) в фотометрическом режиме при 490 нм, предварительно разводя пробу в 10 раз (все данные ОП в данном исследовании приведены в разведении).

Процесс ферментации вели до тех пор, пока ОП не достигнет максимума и не перестанет меняться. После этого КЖ передавали в ферментер 250 л объемом предварительно простерилизованным силиконовым шлангом [183].

При аналогичных условиях провели ряд совместных культивирований *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 в ферментере, объемом 15 литров с рабочим объемом 10 л. Для сокультивирования использовали посевной материал *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 объемом 1 л в соотношении 50:50 каждого штамма [249].

2.4.4 Ферментация в 250 л биореакторе

Стерильную ферментационную среду в 250 л аппарате засеивали посевным материалом из биореактора 15 л. Передачу производили из ферментера 15 л в ферментер 250 л путем предварительно простерилизованного непосредственно на аппаратах силиконового шланга. Данную гибкую силиконовую магистраль одним концом подсоединяли к сливному штуцеру 15 л ферментера, другим – к прободоотборнику 250 л ферментера, там же стерилизовали острым паром в течении 1 часа, затем передавали посевной материал. Количество посевного материала было 10%.

В начале процесса устанавливали давление 0,2–0,3 атм. и перемешивание среды при 100 об./мин. Контроль чистоты ферментации вели аналогично аппарату V=15 л, заканчивали процесс по максимальному спорообразованию через 18–24 часа. После этого КЖ подавали на центрифугу [183].

2.4.5 Концентрирование, лиофилизация, смешивание, фасовка

Концентрирование. Биомассу бактерий концентрировали путем центрифугирования [247] на проточной центрифуге GTGQ-1251 («Zhengzhou Grace Machinery Equipment», Китай) при 15000 об./мин. В асептических условиях, выпавшую в осадок, биомассу смешивали с предварительно простерилизованной

защитной средой в соотношении 1:1. Затем полученную массу распределяли по стерильным лоткам и передавали на следующий этап – заморозку.

Лиофилизация. В камере сублиматора продукт замораживали в течение 8–10 часов при температуре -35°C , или в морозильной камере не менее 12 часов при температуре -25°C . Затем запускали процесс сушки. Программа работы сублиматора состояла из первичной заморозки, первичной сушки и вторичной сушки. Полный цикл лиофилизации занимал 48 часов.

Смешивание с наполнителем. Для получения готового препарата использовали смеситель периодического действия типа «Пьяная бочка», в котором сухой концентрат смешивали в течение 60 минут с мальтодекстрином в соотношении, необходимом для получения конечного титра бацилл в готовом препарате 1×10^{10} КОЕ/г. Пропорцию наполнителя и бактериального концентрата для каждой партии рассчитывали индивидуально.

Фасовка, хранение. Фасовали биопрепарат в полиэтиленовые мешки 50 мкм толщиной, по 10 кг, завязывали, затем полиэтиленовый мешок помещали в kraft-мешок, а в свою очередь, kraft-мешок зашивали [183].

2.5 Исследование токсичности полученного препарата на мышах

2.5.1 Исследование острой токсичности

Испытания проводили на белых беспородных мышах массой 18–22 г. Для определения острой токсичности препарата мыши были распределены по полу самцы и самки на 2 опытные и контрольную группы по 3 головы в каждой, после предварительной оценки состояния их здоровья. Препарат разводили по 500 мг в 1 мл дистиллированной воды (для удобства взвешивания и растворения). Лабораторным животным опытной группы внутрижелудочно вводили суспензию препарата в количестве 0,5 мл на 1 голову (12500 мг/кг). В контрольной группе мышам перорально вводили дистиллированную воду, также однократно, в объеме 0,5 мл. Введение препарата осуществляли с помощью внутрижелудочного зонда.

Наблюдение за лабораторными животными осуществляли непрерывно в течение первых 5 часов опыта для учета клинических симптомов интоксикации. Животных осматривали ежедневно, на протяжении 14 дней [250]. Перед началом опыта и далее с интервалом 7 дней до окончания эксперимента производили взвешивание, после чего мышей подвергли эвтаназии, извлекли внутренние органы (печень, селезенка, почки, сердце) и определили их массу на электронных весах. Расчет массовых коэффициентов производили по формуле: $МК = \frac{\text{Масса органа (г)}}{\text{масса тела (г)}} \times 100\%$ [251].

2.5.2 Исследование хронической токсичности

Испытания проводили также на белых беспородных мышах, самцах и самках массой 18–22 г. Мыши были распределены по полу на опытную и контрольную группы, по 5 самцов и 5 самок в каждой. Препарат в количестве 0,8 г растворяли в 100 мл питьевой воды и разливали в поилки раз в день, ежедневно, в течение 14 дней, по 10 мл на гол./сутки. Мышам контрольной группы выпаивали питьевую воду в таком же объёме.

Наблюдение за мышами вели непрерывно в течение 15 дней. Перед началом опыта и далее с интервалом 7 дней до окончания эксперимента производили взвешивание лабораторных животных, после чего мышей подвергли эвтаназии, извлекли внутренние органы (печень, селезенка, почки, сердце) и определили их массу на электронных весах. Расчет массовых коэффициентов производили по формуле: $МК = \frac{\text{Масса органа (г)}}{\text{масса тела (г)}} \times 100\%$ [251].

2.6 Проведение промышленных испытаний

2.6.1 Инкубирование цист *A. franciscana*

Цисты инкубировали в конусах в течение 48 ч при постоянном барботировании воздухом и стандартных условиях: объём инкубационного раствора – 1 л, соленость – 30 ‰, температура – 25–30 °С, pH – 8,0–8,5,

окислительно-восстановительный потенциал – 148–220 мВ, освещенность – 1500–2000 люкс, количество вносимых цист – 2,0 г, активатор – 0,2 мл 3%-ного раствора H_2O_2 . Долю вылупившихся науплиусов первоначально определяли методом прямого подсчета при помощи бинокулярного микроскопа при $\times 9$.

Опыт состоял из 4 вариантов для каждой из партий цист (1 – контроль, 2, 3, 4 – опытные варианты) в 5-и повторностях. Инкубирование науплиусов обеих партий проводили, используя различные дозы пробиотического препарата (г): 0 (контроль), 0,05, 0,1, 0,2 соответственно, на 2 г сухих цист артемии. Препарат непосредственно вносился в конус с инкубационным раствором одновременно с началом процесса. По истечении 48 часов в каждом конусе подсчитывали процент выклева (HR), применяя стандартный метод и рассчитывали коэффициент биомассы, равный половине от HR [252]. Для расчета процентов выклева в образце использовали следующие формулы:

$$HR^- = \frac{\Sigma N}{\Sigma N + \Sigma C + \Sigma U} \times 100, \quad (2)$$

$$HR^+ = \frac{\Sigma N + \Sigma U}{\Sigma N + \Sigma C + \Sigma U} \times 100, \quad (3)$$

$$HR = \frac{HR^- + HR^+}{2}, \quad (4)$$

где: HR^- – процент выклева без учета эмбрионов (в %);

HR^+ – процент выклева с учетом эмбрионов (в %);

HR – среднее значение между HR^- и HR^+ ;

ΣN – сумма науплиусов (Nauplii);

ΣC – сумма цист (Cysts);

ΣU – сумма эмбрионов (зонтиков), наполовину выклюнувшихся науплиусов (Umbrella).

Для определения количества получившейся биомассы по окончании инкубирования отключали аэрацию, оставляя освещение включенным. Через 10 минут отделяли биомассу (живые науплиусы) от отходов (скорлупы и невыклюнувшихся цист на дне и поверхности конуса) путем осаждения с одновременной концентрацией подвижных науплиусов в освещаемой средней части инкубационного конуса. Затем, лабораторной силиконовой трубкой 4–6 мм

в диаметре через конусовидное сито (диаметр пор – 100 мкм) сливали жидкость с науплиусами из средней части, не захватывая мусор с поверхности и дна конуса.

Для оценки эффективности инкубации артемии вычисляли выход биомассы, т.е. количество биомассы артемии, полученное после инкубации. Для этого использовали газовый сачок, объемом 50 мл, который дважды переключивали на 720 градусов для отжима большей части воды. После чего производили взвешивание на лабораторных весах готовой биомассы артемий, рассчитывали коэффициент биомассы, соответствующий кратности увеличения итоговой сырой массы по сравнению с массой изначально вносимых цист [221].

2.6.2 Испытание пробиотического препарата на креветках *M. rosenbergii*

Потомство креветки одной самки *M. rosenbergii* разделили на 2 группы: контрольная (пробиотический препарат не добавляли) и опытная (в кормлении использовали артемию, предоставленную ООО «Арсал», инкубированную с добавлением препарата, т. н. «обогащенную» артемию из озера Большое Яровое). Каждая группа состояла из 200 личинок, которых выращивали в одинаковых аквариумных системах по 600 литров каждая. Гидрохимические показатели на протяжении всего эксперимента поддерживали в пределах нормы [253–255].

Пробиотический препарат вносили на 20 ч инкубирования цист артемии, когда основная масса науплиусов начинала вылупляться, в количестве 1 г на 100 г сухих цист при общей продолжительности инкубации 24 ч. В бассейн добавляли около 20 г цист в сутки. При кормлении креветок на более поздней стадии развития (15 суток) использовали науплиусы 48 ч инкубации. Препарат также вносили на 20 ч инкубации цист вместе с 0,5 мл суспензии живой спирулины на 1 л инкубационного раствора.

Фиксирование линек креветок осуществляли визуально, чтобы не травмировать животных. При обнаружении в общей массе креветок хотя бы одной, прошедшей линьку, считали, что вся группа прошла очередную линьку, так как начав с одной особи, вся группа заканчивала линьку в течение суток [194].

2.6.3 Анализ воды в установках замкнутого водоснабжения

Подращенную однородную группу из 1000 постличинок креветок разделили поровну на опытную и контрольную группы. Каждую группу на протяжении месяца выращивали в отдельной замкнутой системе объёмом 600 л. При этом в воду, циркулирующую в УЗВ, добавляли пробиотический препарат в количестве 5 г/раз в неделю. Кормление креветок производили сухим кормом. На протяжении месяца проводили замеры основных биогенов – индикаторов биологической очистки – аммонийного, нитритного и нитратного азота [194]. Замеры производили с использованием капельных тестов (колориметрия на аммоний с реактивом Несслера, на нитриты и нитраты по Бендшнайдера и Робинсону [256]).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Потенциал исследуемых штаммов

3.1.1 Генетическая идентификация

***B. toyonensis* B-13249.** При секвенировании переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК получили нуклеотидную последовательность, которая по базе данных GenBank и RDP-II показала, что исследуемый штамм принадлежит к систематическим группам: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Bacillus*. Результаты обработки сиквенсов при помощи RDB II показали, что ближайшими родственниками явились *B. cereus*, *B. toyonensis*, *B. thuringiensis*. Отсутствие фрагментов на электрофореграмме с использованием праймеров BTf и BTr; BAf и BAr, BCf и BCr позволило отнести исследуемый штамм к виду *B. toyonensis*.

***B. pumilus* B-13250.** При секвенировании участков генов, кодирующих 16S рРНК получили нуклеотидную последовательность, по базе GenBank и RDP-II исследуемый штамм принадлежит группам: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Bacillus*. Результаты обработки сиквенсов при помощи RDB II показали, что филогенетически ближайшие представители: *B. vallismortis*, *B. atrophaeus*, *B. altitudinis*, *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stratosphericus*, *B. aerophilus*, *B. xiamenensis*. Наработка фрагмента при использовании видоспецифических праймеров Pum-f и Pum-r и при том, отсутствие фрагментов при использовании Saf-f и Saf-r позволило отнести исследуемый штамм к виду *B. pumilus*.

На основании проведенных исследований получили справки о депонировании обоих штаммов в ВКПМ (приложение 2).

3.1.2 Антагонистическая активность

При подборе штаммов для включения в состав пробиотических препаратов, необходимо учитывать их антагонистическую активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, так как это является важным критерием. Чем шире спектр антагонистической активности отобранных штаммов, тем эффективнее будет действовать биологический препарат против патогенной микрофлоры, циркулирующей на сельхозпредприятиях. В настоящем исследовании в качестве тест-культур использовали 10 микроорганизмов III и IV групп патогенности: *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Candida albicans*, *Ps. aeruginosa*, *B. cereus*, *Salmonella abony*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*; Представленные микроорганизмы широко распространены в природе и являются частыми возбудителями заболеваний у животных, в том числе у водных. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2. Характер воздействия исследуемых штаммов микроорганизмов на патогенные и условно-патогенные тест-культуры

Штамм	Патогенные тест штаммы / характер роста под воздействием метаболитов штамма бациллы* / зона угнетения роста, мм									
	<i>S. 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>S. epidermidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i> 32
<i>B. pumilus</i> B-13250	1 мм лизис + 3 мм ОРШ	б/изм	б/изм	35 мм лизис + ОРВШ	б/изм	б/изм	ОРНШ	10 мм лизис + 25 мм ОРШ	ОРНШ	ОРНШ
<i>B. toyonensis</i> B-13249	2 мм лизис + 20 ОРШ	5 мм ОРНШ	б/изм	40 мм лизис ОРВШ	б/изм	б/изм	15 мм ОРШ	10 мм лизис + ОРВШ	ОРНШ	ОРНШ

*Обозначения:

ОРНШ – ослабление роста в начале штриха тест-штамма (началом штриха патогенного тест штамма считается место его контакта со штрихом штамма антагониста);

ОРШ – ослабление роста штриха тест-штамма;

НОРШ – незначительное ослабление роста штриха тест-штамма;

ОРВШ – ослабление роста всего штриха тест-штамма;

б/изм – без изменений (характер роста тест-штамма в опытном варианте не отличается от роста в контроле);

лизис – отсутствие визуально наблюдаемого роста штриха тест-штамма или следовый его рост.

Характер воздействия исследуемых бацилл на патогенную и условно-патогенную микрофлору можно охарактеризовать следующим образом:

1. высокая литическая активность внеклеточных метаболитов обоих природных штаммов бацилл, использованных в опыте, относительно штамма дрожжеподобного гриба *C. albicans* 620 Y-583;

2. грамположительные штаммы *St. aureus* 201108 B-1266 и *St. epidermidis* ATCC14990 B-1363 проявили высокую чувствительность к воздействию водорастворимых диффундирующих метаболитов штаммов бацилл;

3. грамотрицательные тест-штаммы *E. coli* 6645 ATCC 25922 B-655, *S. typhimurium* 2606 и *Sh. sonnei* 32 проявили низкую чувствительность к метаболитам исследуемых бацилл. К *E. coli* 6645 ATCC 25922 B-655 проявилось влияние метаболитов *B. toyonensis* B-13249. Наблюдался небольшой лизис или угнетение роста *S. typhimurium* 2606 и *Sh. sonnei* 32 с обоими исследуемыми штаммами;

4. грамотрицательный штамм *S. abony* 103/39 был чувствителен к воздействию культур бацилл *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249, заметно антибиотическое действие на данный штамм;

5. воздействия на штаммы *Ps. aeruginosa* 6643 B-1295, *B. subtilis* 6644 ATCC 6633 B-654 и *B. cereus* 37 ATCC 10702 B-1367 обеих культур выражено незначительно, что говорило о малой чувствительности к метаболитам исследуемых культур к тест-штаммам.

Таким образом, оба исследуемых штамма обладали высокой антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре и могут быть рекомендованы для включения в состав пробиотического препарата.

3.1.3 Антибиотикорезистентность штаммов

В настоящее время проблема антибиотикоустойчивости у бактерий является актуальной для всех воспроизводимых объектов сельского хозяйства, в том числе аквакультуры. Распространение резистентности бактерий к антибиотическим препаратам представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире [257]. Серьезность этой проблемы усугубляется возможностью бактерий

горизонтально передавать детерминанты резистентности патогенам и комменсальной кишечной микробиоте человека. Некоторые пробиотические штаммы с внутренней устойчивостью к антибиотикам призваны быть полезными для восстановления микробиоты кишечника после лечения антибиотиками [258]. В последние годы активно разрабатываются пробиотики, призванные минимизировать употребление антибиотиков [242]. Оба исследованных штамма оказались чувствительны к основным группам антибиотиков (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели чувствительности штаммов к антибиотикам

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

Для обоих штаммов зафиксировали чувствительность к 5 из 6 тестируемых антибиотиков, поэтому в случае применения данных микробов в качестве пробиотических препаратов на объектах аквакультур они не смогут передать патогенным бактериям гены антибиотикорезистентности. С другой стороны, полученные данные делают невозможным прием препарата, содержащего исследуемые штаммы микроорганизмов, во время антибиотикотерапии исследованными антибиотиками (5 из 6). При этом оба штамма оказались устойчивы к оксациллину, это может быть связано с тем, что штаммы группы *B. cereus* обычно устойчивы к β -лактамам в результате продукции ферментов β -лактамаз [259], а также большое количество видов этой группы содержат гены устойчивости к антибиотикам [260, 261]. *B. toyonensis* B-13249 относится к этой группе микроорганизмов, вследствие чего, высока вероятность, что данный штамм также располагает генами резистентности к β -лактамам антибиотикам, в том числе к оксациллину, это подтверждается и низкой чувствительностью к бензилпенициллину 2,8 ($\pm 0,2$) мм. Некоторые бактерии

группы *B. subtilis*, к которым относится и *B. pumilus* В-13250, также обладают генами резистентности к оксациллину [262].

3.1.4 Продукция метаболитов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249

3.1.4.1 Оценка накопления белков методом электрофореза белков в ПААГ

Метаболиты пептидной природы представителей рода *Bacillus* такие как антибиотики [87, 105, 263–265], белки [101–103, 265] и ферменты [137, 141, 266, 267] являются востребованными с практической точки зрения. Наличие данных веществ значительно повышает пищевую ценность субстрата и метаболитов при вскармливании пробиотиком, вследствие их накопления.

Качественный анализ КЖ проводили с помощью электрофоретического разделения в ПААГ. Этот метод позволил оценить чистоту и целостность белка, в том числе количество и относительное соотношение белковых фракций, содержащихся в пробе [268]. Для проведения электрофоретического разделения готовили 15%-ый полиакриламидный гель, толщиной 0,75 мм. Концентрацию белка в образце определяли с помощью связывания с красителем, используя образцы бычьего сывороточного альбумина (BSA) с известной концентрацией в качестве стандартов [269]. Контрольный раствор BSA характеризовался полосой, соответствующей молекулярному весу порядка 66–68 кДа [270].

При изучении интенсивности накопления метаболитов белковой природы оба исследуемых штамма выращивали предварительно в качалочных колбах на L-среде (24 ч) в шейкере-инкубаторе при 37 °С в трех вариантах: 1 – штамм *B. toyonensis* В-13249, 2 – штамм *B. pumilus* В-13250, 3 – оба штамма в соотношении 1:1. Результаты электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле представлены на рисунке 3.

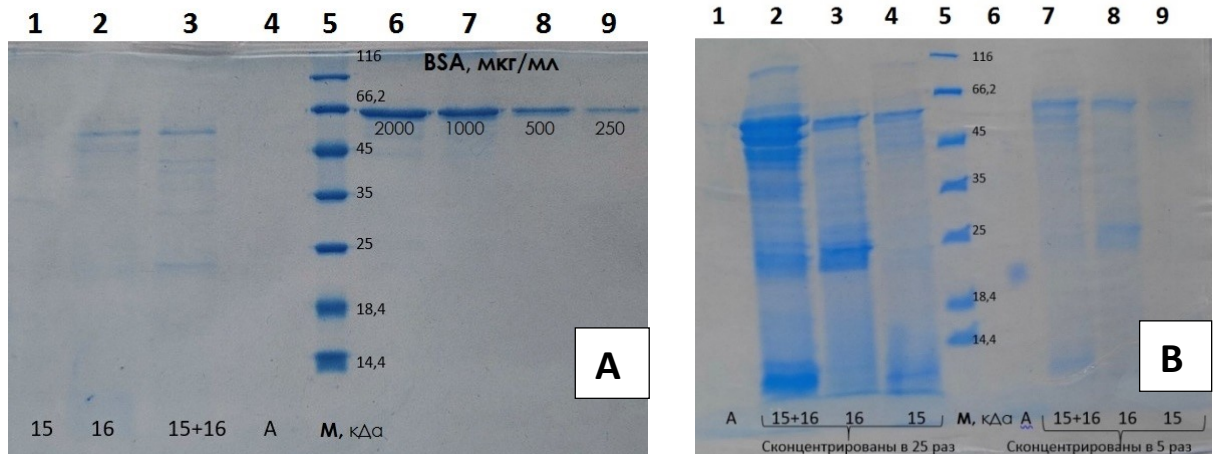


Рисунок 3 – Электрофореграмма разделения белков, после 24 ч культивирования на L-среде. **А** – без концентрирования: 1 – *B. toyonensis* B-13249; 2 – *B. pumilus* B-13250; 3 – совместное выращивание *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250; 4 – экспериментальный образец, не учитывается; 5 – маркер; 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* B-13249 и *B. pumilus* B-13250, конц-е в 25 раз; 3 – *B. pumilus* B-13250 конц-е в 25 раз; 4 – *B. toyonensis* B-13249 конц-е в 25 раз; 5 – маркер; 7 – совместное выращивание *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250, конц-е в 5 раз; 8 – *B. pumilus* B-13250 конц-е в 5 раз; 9 – *B. toyonensis* B-13249 конц-е в 5 раз.

При первичной проверке КЖ, обнаружено, что у штамма *B. pumilus* B-13250 происходит накопление нескольких видимых белков (наличие бендов) размером от 18,4 кДа до 66,2 кДа (рисунок 3А). Поскольку у штамма *B. toyonensis* B-13249 на данной электрофореграмме белки были слабо различимы и малозаметны, было необходимо провести концентрирование культуральной жидкости для получения более четкой картины. Следует отметить, что при совместном культивировании исследуемых штаммов наблюдаемые бенды становятся выразительнее, что говорит о совместимости исследуемых культур.

Одной из важных характеристик КЖ, содержащей белки, является возможность белков к концентрированию, увеличивая содержание в пробе и активность, в зависимости от подобранных условий концентрирования. Электрофорез в ПААГ позволяет детектировать увеличение концентрации белков в культуральной жидкости в результате проведенного концентрирования, результаты представлены на рисунке 3В. В культуре *B. toyonensis* B-13249 при концентрировании становились видимы белки с молекулярной массой в диапазоне от 18,4 кДа до 66,2 кДа, но в меньшем количестве, чем в образце КЖ *B. pumilus* B-

13250. Полученные данные доказали, что белки действительно присутствуют в КЖ и поддаются концентрированию. Проведение электрофореза также подтвердило, что при сокультивировании присутствует весь спектр производимых веществ. Для понимания общей производственной картины при замене питательной среды (с L на МК-ОС в ферментере) необходимо было понять, как меняется спектр белковых метаболитов у изучаемых культур. Для этого в ферментере объемом 250 л на МК-ОС в течение 24 часов производилось культивирование каждого штамма. После чего отобранные пробы КЖ центрифугировались и концентрировались методом ультрафильтрации. Данные электрофоретического разделения белков в КЖ после ферментации в промышленном аппарате и последующем ее концентрировании представлены на рисунке 4.

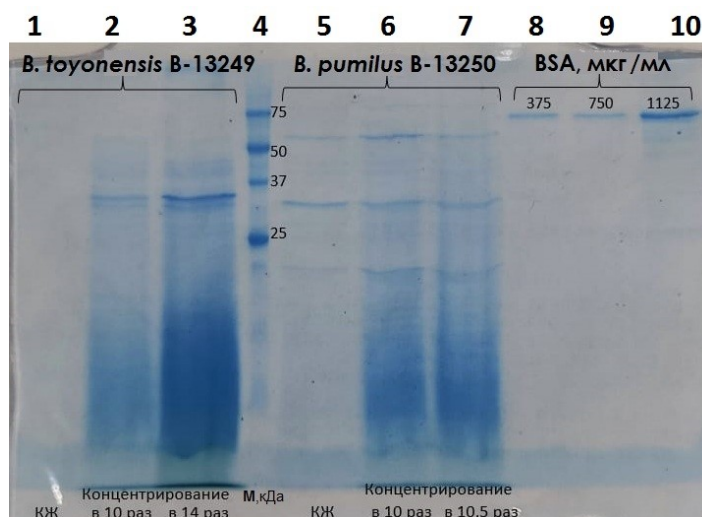


Рисунок 4 – Электрофореграмма разделения белков при культивировании в ферментере (250 л) на МК-ОС после 24 ч наработки: 1-3 – образцы культуральной жидкости *B. toyonensis* B-13249: 1 – без конц-я; 2 – конц-е в 10 раз; 3 – конц-е в 14 раз; 4 – маркер; 5-7 – образцы культуральной жидкости *B. pumilus* B-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.

Электрофоретическое разделение белков после ферментации в промышленном аппарате показало, что культура *B. pumilus* B-13250 стала накапливать даже большее разнообразие белков: помимо хорошо видимых в предыдущем опыте (рисунок 3) белков с молекулярной массой на уровне ~ 22 кДа и ~57 кДа, стал видим белок с молекулярным весом на уровне ~ 34 кДа. Культура *B. toyonensis* B-13249 также сохранила свои первичные показатели: были обнаружены белки с молекулярной массой на уровне ~ 36 кДа и ~ 50 кДа. Таким

образом, полупромышленное глубинное культивирование на МК-ОС не сказалось отрицательно, поскольку метаболиты стали накапливаться даже в большем количестве, чем при наработке в качалочных колбах. Проведение концентрирования позволило дополнительно выявить белки, которые изначально не были заметны на электрофорезе.

3.1.4.2 Оценка накопления метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС

Поиск метаболитов в биологических образцах требовал использования чувствительного оборудования, которое обычно включает хроматограф для разделения соединений и детектор для их идентификации. Наиболее подходящим и наиболее часто используемым методом поиска и идентификации неизвестных веществ является ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией наиболее чувствителен, поэтому чаще всего и используется для биоанализа [245].

Данным методом проанализировали 398 метаболитов с помощью ВЭЖХ-МС/МС с целевым анализом веществ в режиме MRM с использованием переключения положительной/отрицательной поляризации с последующим относительным количественным определением соединений. После анализа образцов полученные хроматограммы интегрировали и результаты обрабатывали статистическими методами.

Чтобы получить значимость разницы между средним уровнем метаболитов в образцах надосадочной жидкости *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 с образцом контрольной стерильной питательной среды, использовали t-критерий Стьюдента. Провели сравнение между соответствующими образцами надосадочных жидкостей после суточного культивирования каждого исследуемого штамма и стерильной питательной ферментационной средой.

Из 355 метаболитов выявили 117, которые достоверно различались между сравниваемыми группами. Значимые корреляции наблюдали для 80 метаболитов у *B. toyonensis* В-13249, а также для 80 веществ *B. pumilus* В-13250 (рисунок 5). Из

них, достоверное накопление метаболитов (синтез), относительно среды, зафиксировали по 43 одинаковым наименованиям метаболитов (приложение 3) по сравнению со средой, а также по 37 по-отдельности у каждого из штаммов разных веществ (приложение 4, 5) в сравнении со стерильной средой.

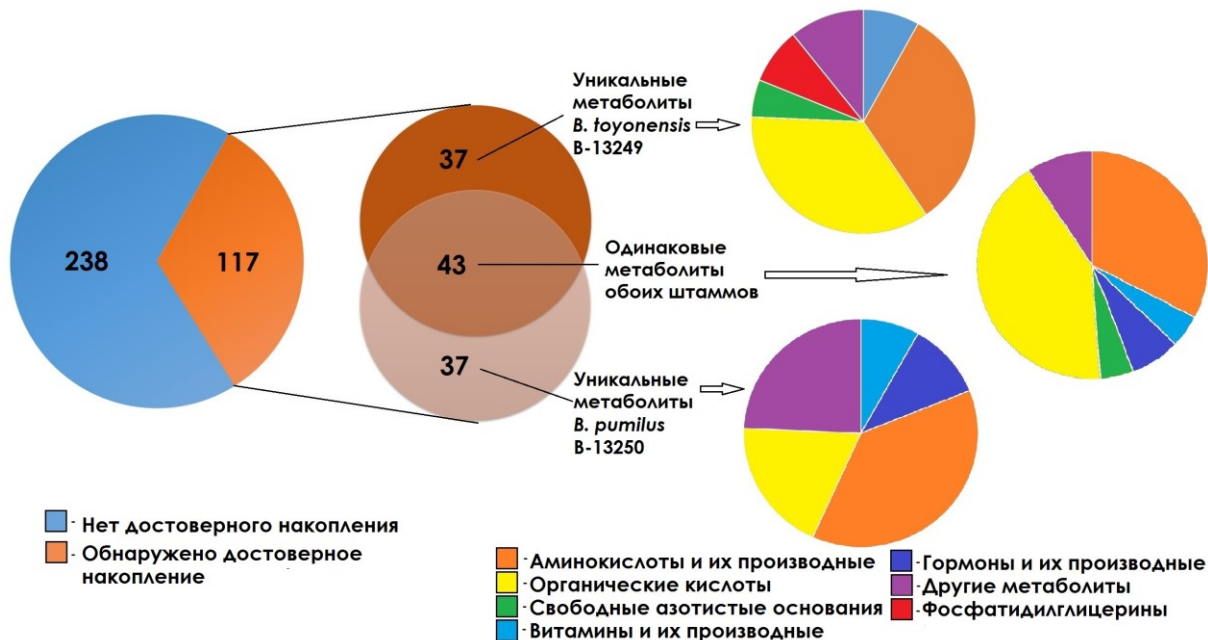


Рисунок 5 – Накопление и определение метаболитов исследуемых штаммов.

Наибольшее накопление метаболитов для штамма *B. toyonensis* B-13249 выявили по 3 веществам: малоновая кислота, 3-гидроксibuтират, 2-кетоглюконат. По данным метаболитам уровень накопления по сравнению с исходной средой вырос на 2 и более порядка. Помимо этого, у данного штамма обнаружили накопление 77 других метаболитов: из них 29 метаболитов выше на 1 порядок по сравнению со средой и уровень 48 метаболитов менялся в пределах 1 порядка.

Значительное накопление метаболитов *B. pumilus* B-13250 зафиксировали по 7 веществам: малоновая кислота, 3-гидроксibuтират, гуанозинтрифосфат, фосфатидилхолин (РС (16:0/18:2)), 3-метилфенилуксусная кислота, триметиламиноксид, бутирилкарнитин; аналогично предыдущей культуре, по данным метаболитам уровень накопления по сравнению с исходной средой вырос на 2 и более порядка. Помимо этого, у данного штамма обнаружили накопление 73 других метаболитов: из них 29 метаболитов выше на 1 порядок по сравнению со средой и уровень 44 метаболитов менялся в пределах 1 порядка.

Выявили, что при разделении на группы соединений, обеими исследуемыми культурами в среду роста происходил обильный синтез сходных для обоих штаммов метаболитов:

1. Аминокислоты и их производные: гистидинол, N-ацетил-L-глутаминовая кислота, L-цистеин S-сульфат, α -кетоизовалериановая кислота, N-ацетил-L-аланин, N(теле)-метил-L-гистидин, гидроксипролин, β -аланин, кетолейцин, тиглилглицин, цистин; Производные карнитина: 2-октеноил-L-карнитин, ацетилкарнитин.

2. Витамины и их производные: α -кетоизовалериановая кислота – предшественник пантотеновой кислоты, никотинамидрибозид (форма В₃).

3. Гормоны: адреналин (эпинефрин), кортизол (гидрокортизон), серотонин.

4. Свободные формы азотистых оснований: 7-метилгуанин, 1-метиладенин.

5. Органические кислоты: (S)-2-гидрокси-3-метилмасляная кислота, фенилпируват, α -гидроксиглутаровая кислота, хинолиновая кислота, итаконовая кислота, малоновая кислота, 2,3-дигидроксибензойная кислота, гиппуровая кислота, оротовая кислота, цитрамаловая кислота, гомогентизиновая кислота, 4-гидроксифенилуксусная кислота, α -кетоглутаровая кислота, анандамид, D- β -гидроксимасляная кислота, 2-метиллимонная кислота, 2-оксогексановая кислота, креатин.

6. Также был обнаружен ряд других метаболитов, не входящие в описанные группы: N-ацетилспермидин, N-ацетилпутресцин, N-ацетилглюкозамин, флавоон, креатинин, акадезин.

Культура *B. toyonensis* В-13249 продуцировала следующие уникальные группы метаболитов (приложение 4):

1. Аминокислоты и их производные: N-ацетил-L-серин, цистеин, O-ацетилсерин, серин, метионин, N-ацетилглутаминовая кислота, треонин, ацетиллизин, агматин – образуется при декарбоксилировании аргинина, антраниловая кислота, индол, N-карбамоил-L-аспарагиновая кислота.

2. Органические кислоты: гуанидиноуксусная кислота, молочная кислота, L-2-аминоадипиновая кислота, 3-фенилмолочная кислота, цитраконовая кислота,

аминогиппуровая кислота, изопропиляблочная кислота, фенилпропиоловая кислота, 2-кето-L-глюконат, индол-3-карбоновая кислота, щавелевоуксусная кислота – оксалоацетат, 2-аминооктановая кислота, (S)-1-пирролин-5-карбоновая кислота.

3. Фосфатидилглицерины: 32:2, 34:1, 34:2.

4. Витамины и производные: 1-метилникотинамид – метилированный амид никотинамида (витамин B₃), пиридоксаль (форма витамина B₆).

5. Вещества, используемые в промышленности в виде вкусовых добавок и консервантов: ксантин, 2-кето-L-глюконат, глюконо-дельта-лактон.

6. Ряд других веществ: 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид, этаноламин, ацетилхолин, 7H-пурин.

Иные метаболиты имела культура *B. pumilus* B-13250 (приложение 5):

1. Аминокислоты и их производные: гомоцистеиновая кислота, карнозин, L-гомоцистеин, 1-кинуренин, аргининоянтарная кислота; Формы L-карнитина: О-изовалерилкарнитин, О-адипоилкарнитин, 3-гидроксигексадеканоилкарнитин О-бутаноил-L-карнитин, 3-гидроксиизовалерилкарнитин, О-пимелил-L-карнитин, О-малонил-L-карнитин, 3-гидроксилинолеоилкарнитин, суберилкарнитин.

2. Витамины и их производные: пантотеновая кислота (B₅), рибофлавин (витамин B₂), тиамин (витамин B₁).

3. Гормоны и производные: норадреналин, мелатонин, норметанефрин, тестостерон.

4. Органические кислоты: α-кетомасляная кислота, гомованилиновая кислота, ацетоуксусная кислота, салицилуровая кислота, мевалоновая кислота, 3-метилфенилуксусная кислота, докозагексаеновая кислота.

5. Другие метаболиты: глюкозамин, гуанозин-5'-трифосфат, спермин, 1-гексадецил-2-sn-глицеро-3-фосфохолин – фосфатидилхолин О-34:2, N-оксид триметиламина, гипотаурин, дигидроланостерол, простагландин F2α, неоптерин.

Таким образом, оба исследованных штамма выделяли разнообразные метаболиты, в том числе большое количество аминокислот и их производных. Данный факт повысил питательную ценность пробиотического препарата на

основе консорциума данных микроорганизмов из-за способности обогатить свободными аминокислотами как корма, так и желудочно-кишечный тракт производимых представителей аквакультур – хозяев, т.к. сами выступают в роли их продуцентов. Поиск продуцентов аминокислот в настоящее время актуален по нескольким причинам: данный класс веществ используется в качестве лечебных компонентов, в пищевой промышленности – в качестве антиоксидантов, в сельском хозяйстве – в качестве кормовых добавок для балансирования белкового питания.

Доказали, что обе культуры в процессе жизнедеятельности интенсивно продуцировали водорастворимые витамины группы В (B_3 и B_5 в разных формах), которые осуществляют свои функции в составе коферментов у многих систематических групп организмов, являются ростовыми факторами, участвуют в углеводном и липидном обмене, в промышленности и сельском хозяйстве входят в рационы питания. Штамм *B. pumilus* B-13250 также продуцировал витамины B_1 и B_2 , которые также в сельском хозяйстве применяются для обогащения витаминами кормов производимых животных объектов, в том числе аквакультур, в качестве ростостимулирующих факторов. *B. toyonensis* B-13249 дополнительно продуцировал витамин B_6 , который также входит в состав ферментов и участвует в метаболизме аминокислот. Следовательно, разработанный пробиотический препарат должен способствовать лучшей усваиваемости пищи, интенсивному набору массы, восстановлению и поддержанию обменных процессов.

Еще одна группа метаболитов, накапливаемая исследуемыми культурами – гормоны, которые сами по себе способны дополнительно выполнять регуляторные функции в организмах хозяев, а также участвовать в регуляции роста, регуляции обменных процессов и разных систем организмов – хозяев.

Наличие метаболитов в виде органических кислот разного профиля и молекулярного состава для представителей аквакультуры и животных, которым в рацион питания добавляется пробиотический препарат, может способствовать более стабильной кислотности, т.к. органические кислоты выступают в качестве регуляторов, а также способствуют ускорению физиологических процессов.

3.2 Разработка технологии производства пробиотического препарата для аквакультур

3.2.1 Определение оптимальных условий глубинного культивирования штаммов *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249

При глубинном культивировании микроорганизмов в ферментационных установках и качалочных колбах показатели жизнедеятельности (численность, активность и т.п.) бактерий часто отличаются. При этом рекогносцировочные эксперименты оптимальнее проводить на колбах в целях экономии времени и средств, а затем уже масштабировать в ферментационных установках.

Определение оптимальной температуры и активной кислотности при глубинном культивировании проводили на качалочных колбах в шейкере-инкубаторе «Innova 44». Масштабирование культивирования проводили на лабораторно-опытных ферментационных установках, вместимостью 15 и 250 литров, периодического действия, оснащенных механическим перемешивающим устройством с регулируемым числом оборотов разноуровневых мешалок и принудительными системами барботирования. Каждый ферментер также снабжен системами автоматической терморегуляции и pH-статирования. Управление процессом компьютеризовано, либо производили непосредственно на пульте автоматической системы управления.

3.2.1.1 Подбор питательных сред

Для развития любого микроорганизма и обеспечения жизненных функций необходимы различные элементы: углерод, азот, кислород, водород, фосфор, сера, калий, натрий, магний, железо, кальций и т.д. Для синтеза клеточных элементов каждый живой организм должен быть обеспечен энергией. Для прокариот все целевые потребности способны обеспечить компоненты питательных сред [271]. Большинство промышленных штаммов одновременно используют углеводсодержащие соединения как для обеспечения потребностей в энергии, так

и в качестве источника углерода. При этом разные прокариоты способны питаться различными углеводсодержащими соединениями [272]. Азот, фосфор, макро- и микроэлементы в питательных средах чаще всего представлены в виде солей [273]. При выборе питательной среды для промышленного культивирования, необходимо учитывать физиологические потребности микроорганизмов и стоимость сырья.

Многие микроорганизмы растут на простых, стандартных средах: L, LB, YT, YEP, МПБ и др., основой которых являются пептоны, триптоны, дрожжевой экстракт в качестве источников азота и углерода, дополнительно вносится глюкоза в качестве самого простого источника углерода и NaCl как источник ионов натрия, необходимых для транспорта и осмотического баланса.

В качестве основной исследовательской среды нами выбран L-бульон – это среда, оптимальная для выполнения исследовательских задач, подходит для использования в лабораторных условиях, является накопительной средой для наращивания максимального количества микроорганизмов. В качестве альтернативы для выращивания посевного материала была исследована ГПД с добавлением глюкозы, микро- и макроэлементов. При выращивании инокулята в колбах при 37 °C на обеих средах оба исследуемых штамма вырастали за 18–24 ч. При этом после роста бацилл на ГПД зафиксировали значение pH в среднем 5,74 ($\pm 0,22$), что достаточно неблагоприятно для бактерий р. *Bacillus*. После роста на L-среде значение водородного показателя было более оптимальным для изучаемых микроорганизмов и составило 7,39 ($\pm 0,28$). Подобные различия можно объяснить тем, что в составе используемых сред в качестве основных питательных компонентов выступали разные субстраты. ГПД среда богата глюкозой – наиболее простым, легко усвояемым источником углерода, потребление которого происходит очень быстро и клетки резко окисляют культуральную жидкость, по истощении глюкозы в среде бациллам приходится перестраиваться на другие источники питательных веществ – пептон и дрожжевой экстракт, что также занимает время и ресурсы самих клеток. Пептоны представляют собой продукт переваривания белковых веществ под влиянием ферментов желудка и сока поджелудочной железы, в данный момент изготавливаются искусственно из мяса,

молока, рыбы. Пептон в составе содержит азот в форме легко усвояемых бактериями соединений и небольшое количество крупных полипептидов, которые и служат источниками питания. Дрожжевой экстракт представляет собой хорошо растворимую в воде смесь свободных пептидов и аминокислот, которая образуется в результате расщепления дрожжей за счет ферментов. Дрожжевой экстракт обеспечивает микроорганизмы витаминами и азотистыми основаниями.

Численность живых клеток при культивировании посевного материала на изучаемых средах отличалось: штамм *B. pumilus* В-13250 на ГПД имел численность КОЕ/мл $4,72(\pm 0,20) \times 10^8$, на L-бульоне – $2,42(\pm 0,12) \times 10^9$; штамм *B. toyonensis* В-13249 на ГПД – $4,60(\pm 0,15) \times 10^8$; на L-среде – $5,91(\pm 0,25) \times 10^9$. Эти факты говорили о том, что L-среда является наиболее благоприятной для выращивания посевного материала в колбах, так как на ней бациллы достигали более высокого титра, кроме того, в L-бульоне сохранялся более благоприятный для бактерий р. *Bacillus* уровень рН. ГПД же среду лучше использовать непосредственно в ферментере ввиду возможности осуществления контроля за водородным показателем [274].

Также отметили, что при суточном (24 ч) культивировании основная масса бацилл на ГПД и на L-бульоне не выпадала в споры, что не оправдывало ферментационный процесс, где основным критерием окончания культивирования являлся максимальный процент спорообразования, зато являлся положительным фактором при использовании сред в качестве инокуляционных, т.к. клетки находились в вегетативной форме и готовы к дальнейшему культивированию. Это намного сокращает лаг-фазу при культивировании споровых бактерий.

Исследование параметров глубинного культивирования непосредственно в ферментационном аппарате проводили на трех средах разного состава: ПС, МК-ОС, а также МК-БС, интегрированной и оптимизированной из первых двух. Установили, что оба штамма в начале ферментации увеличивали количество клеток, изменялся их размер, активно потреблялись питательные вещества из среды, что вело к снижению показателя рН и количества растворенного кислорода. Через 6–8 ч культивирования, практически во всех вариантах титрование заканчивалось, начиналось выделение в среду метаболитов. Поскольку в этот

период происходило пенообразование, регулировку количества пены производили подключением перистальтического насоса, отвечающего за подачу пеногасителя.

После того как микроорганизмы использовали все питательные элементы среды, наблюдали повышение уровня pH, что косвенно говорило о начале активного спорообразования, во время которого бациллы активно дышали, поэтому в это время интенсивную аэрацию не прекращали. После окончания спорообразования уровень растворенного кислорода достигал 100%, что указывало на отсутствие дыхания и окончании процесса ферментации.

На протяжении всего процесса культивирования в биореакторе производили замеры ОП среды. По стабилизации pH ОП среды практически не изменялась. При наступлении фазы активного спорообразования ОП уменьшалась незначительно (22–24 ч роста) и после принимала постоянное значение. Это свидетельствовало о том, что культура полностью перешла в споры, что также подтверждалось микроскопией. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Технологические показатели ферментации

Время, ч	Среда	рН		Оптическая плотность	
		Штамм			
		<i>B. pumilus</i> B-13250	<i>B. toyonensis</i> B-13249	<i>B. pumilus</i> B-13250	<i>B. toyonensis</i> B-13249
0	ПС	6,88 (±0,15)	6,69 (±0,01)	0,351 (±0,014)	0,311 (±0,015)
	МК-ОС	6,81 (±0,01)	6,92 (±0,04)	0,490 (±0,021)	0,490 (±0,002)
	МК-ОС	6,63 (±0,16)	6,88 (±0,11)	0,639 (±0,030)	0,531 (±0,019)
2	ПС	6,82 (±0,02)	6,80 (±0)	0,387 (±0,012)	0,340 (±0,010)
	МК-БС	7,00 (±0,03)	6,95 (±0,15)	0,701 (±0,033)	0,635 (±0,032)
	МК-ОС	6,91 (±0,05)	7,13 (±0,22)	1,187 (±0,056)	0,795 (±0,024)
4	ПС	6,95 (±0,03)	7,15 (±0,08)	0,656 (±0,010)	0,454 (±0,020)
	МК-БС	7,33 (±0,07)	6,96 (±0,15)	1,183 (±0,041)	0,764 (±0,027)
	МК-ОС	7,21 (±0,31)	8,06 (±0,15)	1,706 (±0,081)	1,464 (±0,013)
6	ПС	7,10 (±0,10)	7,31 (±0,02)	0,845 (±0,015)	0,686 (±0,032)
	МК-БС	7,52 (±0,21)	7,07 (±0,26)	1,592 (±0,032)	1,218 (±0,014)
	МК-ОС	7,57 (±0,35)	8,47 (±0,15)	1,931 (±0,092)	1,672 (±0,012)
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)

При использовании ПС оказалось, что оба исследуемых штамма через 24 часа культивирования нарастают до минимальной, по сравнению с другими испытуемыми средами, ОП: у штамма *B. toyonensis* B-13249 (1,133 (±0,050)) и *B.*

pumilus В-13250 – 0,984 ($\pm 0,007$), при этом имели, близкое к оптимальному, значение рН (*B. pumilus* В-13250 – 7,96 ($\pm 0,27$); *B. toyonensis* В-13249 – 6,89 ($\pm 0,01$)). Однако отметили, что стабильный рост наблюдали у обеих культур, судя по равномерно растущему показателю ОП.

Важнейшим показателем успешного культивирования является количество живых клеток (КОЕ) *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 через 24 часа (таблица 5). Выявили, что на ПС также исследуемые микроорганизмы не набирали максимального производственного титра ни в жидком виде (КОЕ/мл: *B. pumilus* В-13250 – $2,44(\pm 0,11) \times 10^9$; *B. toyonensis* В-13249 – $7,70(\pm 0,35) \times 10^8$), ни в лиофильно высушенном (КОЕ/г: *B. pumilus* В-13250 – $8,50(\pm 0,40) \times 10^{10}$; *B. toyonensis* В-13249 – $6,50(\pm 0,32) \times 10^{10}$). Масса высушенных концентратов бацилл тоже была низкая (*B. pumilus* В-13250 – 40,01 ($\pm 1,35$) г; *B. toyonensis* В-13249 – 69,79 ($\pm 2,77$) г). Также стоит учитывать, что в производственных условиях обработка больших объемов отрубей (варка, отжим, фильтрация) увеличивала трудозатраты, время подготовки.

Таблица 5 – Численность микроорганизмов

Сре- да	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 ($\pm 1,35$)	69,79 ($\pm 2,77$)
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 ($\pm 3,15$)	69,70 ($\pm 2,55$)
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 ($\pm 6,36$)	106,22 ($\pm 5,22$)

На питательной среде МК-БС у штамма *B. pumilus* В-13250 показатель ОП был, значительно, выше ($2,284 (\pm 0,051)$), чем на ПС, что говорило о более правильном выборе компонентов питательной среды для данной культуры. Культура *B. toyonensis* В-13249 также улучшила свой показатель ОП ($1,713 (\pm 0,070)$) по сравнению с ПС. Стабильный рост и увеличение ОП наблюдали также у обеих культур. При ферментации на МК-БС обе бактерии значительно улучшили основные количественные показатели штаммов (таблица 5). Обе культуры увеличили титр в жидком виде, КОЕ/мл: *B. pumilus* В-13250 – $3,89(\pm 0,14) \times 10^9$; *B.*

toyonensis В-13249 – $7,20(\pm 0,30) \times 10^8$; в лиофильно высушенном виде: КОЕ/г: *B. pumilus* В-13250 – $3,10(\pm 0,12) \times 10^{11}$. При этом культура *B. toyonensis* В-13249 в сухом виде имела титр на порядок ниже необходимой для производства – $4,00(\pm 0,10) \times 10^{10}$ КОЕ/г. Масса высушенных концентратов бацилл *B. pumilus* В-13250 – $62,99 (\pm 3,15)$ г и *B. toyonensis* В-13249 – $69,70 (\pm 2,55)$ г (таблица 4).

Максимальное значение ОП через 24 ч культивирования было зафиксировано у штамма *B. pumilus* В-13250 на МК-ОС – $2,400 (\pm 0,085)$. Культура *B. toyonensis* В-13249 на данной среде тоже имела наилучшее значение ОП ($2,042 (\pm 0,042)$).

Одной из главных положительных особенностей использования МК-ОС в качестве основной ферментационной, явилось накопление максимального количества биомассы по ходу процесса ферментации. Если обратить внимание на данные из таблицы 5, то количество сухой лиофильно-высушенной биомассы *B. pumilus* В-13250 – $134,39 (\pm 6,36)$ г, что значительно выше, чем во всех предыдущих экспериментах со средами; *B. toyonensis* В-13249 – $106,22 (\pm 5,22)$ г, что также больше, чем в предыдущих экспериментах. В качестве прототипа нашей МК-ОС взяли варианты производственных составов сред по данным патента В. В. Джавахии с коллегами [232]. В качестве основы остались меласса и кукурузный экстракт, дополнительно добавили источники азота и углерода: пептон и дрожжевой экстракт; а также соли (сульфаты, хлориды) в качестве источников макро- и микроэлементов. С данным изменением ферментационной среды значительно улучшились основные количественные показатели обоих штаммов при культивировании: обе культуры накопили максимальный титр как в жидком виде, КОЕ/мл: *B. pumilus* В-13250 – $8,30(\pm 0,36) \times 10^{10}$; *B. toyonensis* В-13249 – $2,50(\pm 0,12) \times 10^{10}$, так и в лиофильно высушенном, КОЕ/г: *B. pumilus* В-13250 – $5,80(\pm 0,25) \times 10^{11}$, что сравнимо с титром, полученным на МК-БС; культура же *B. toyonensis* В-13249 имела титр стабильно нарастающий до производственного – $3,60(\pm 0,05) \times 10^{11}$.

Наилучшие результаты роста исследуемых штаммов на средах МК-ОС и МК-БС может быть связано с тем, что в составе данной среды используется меласса, богатая сахарозой, азотом, бетаином, рафинозой и другими факторами роста.

Также в качестве органических источников азота в этих средах использовали кукурузный экстракт – побочный продукт кукурузно-паточного производства, количество азотсодержащих веществ в котором составляет 40–50%.

По технологическим показателям ведения процесса глубинного культивирования выявлено, что МК-ОС явилась оптимальной средой, т.к. у обоих штаммов наблюдался стабильный рост, укороченная лаг-фаза, длинная лог-фаза и максимальное накопление биомассы. ПС не выгодна в производстве из-за наименьшего уровня ОП и количества накапливаемой в течении суток биомассы, а также дополнительных трудо- и тарозатрат на предварительную обработку отрубей. МК-БС по показателю ОП незначительно, но уступала МК-ОС, по уровню накопления биомассы разница уже наиболее значима, что выделяет МК-ОС, как наиболее перспективную для использования в качестве промышленной.

Для штамма *B. pumilus* В-13250 через 24 часа культивирования наилучшие показатели ОП – 2,400 ($\pm 0,085$), количество КОЕ/мл – $8,30(\pm 0,36) \times 10^{10}$, КОЕ/г после лиофильной сушки – $5,80(\pm 0,25) \times 10^{11}$ достигнуты на среде МК-ОС. Для культуры *B. toyonensis* В-13249 максимальный показатель ОП составил 2,042 ($\pm 0,042$), КОЕ/мл составило $2,50(\pm 0,12) \times 10^{10}$, а после сушки – $3,60(\pm 0,05) \times 10^{11}$ КОЕ/г. Данные показатели также достигнуты на МК-ОС, что для обеих культур делает ее наиболее оптимальной.

Использование L-среды оправдано в качестве накопительной только в колбах, использование ее в качестве ферментационной не выгодно, поскольку себестоимость литра культуральной жидкости выше других при расчете на объем загружаемой среды в биореактор.

Использование ГПД оправдано в качестве питательной среды для выращивания инокулята, но по микробиологическим показателям не оправдано ее использование в колбах, т.к. культуры имеют титр ниже чем на L-среде.

Из результатов исследования можно заключить, что на МК-ОС выход биомассы *B. pumilus* В-13250 – 134,39 ($\pm 6,36$) г, культура достигает до производственного удовлетворяющего титра $(5,80(\pm 0,25) \times 10^{11}$ КОЕ/г). Использование данной среды в качестве основной ферментационной для культуры

B. toyonensis В-13249 также оправдано, поскольку количество получаемой биомассы с цикла ферментации (106,22 ($\pm 5,22$) г) значительно превышает полученную биомассу на других средах. К тому же, только при использовании данной обогащенной среды исследуемый штамм нарастает до необходимого производственного титра ($3,60(\pm 0,05) \times 10^{11}$ КОЕ/г).

Таким образом добавление в основную ферментационную среду пептона и дрожжевого экстракта оправдано, так как происходило значительное увеличение количества и биомассы клеток, что в свою очередь сокращало количество ферментационных циклов [275].

3.2.1.2 Подбор дозы инокулята

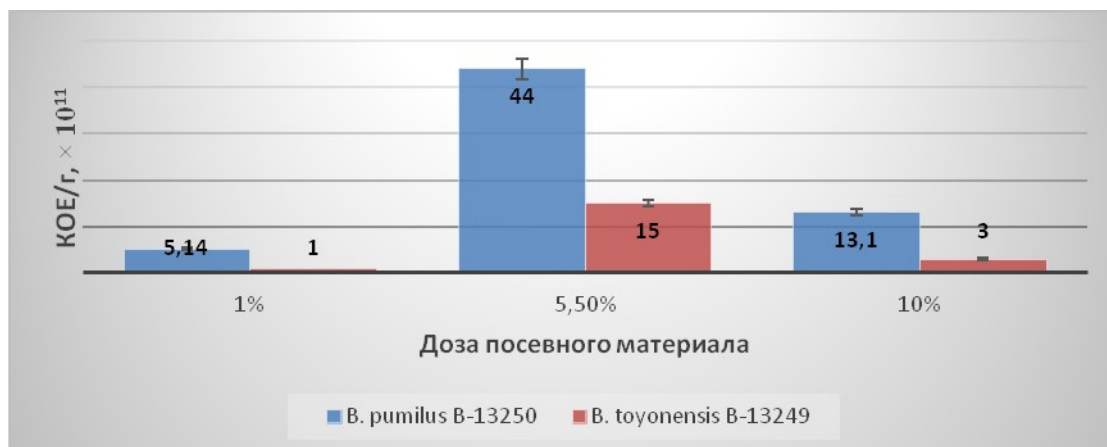
Цикл развития бактериальной культуры начинается с помещения инокулята в благоприятную среду для ее роста. Посев осуществляется таким образом, чтобы количество посевного материала обеспечивало начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой [276]. Как правило, внесение небольшого количества инокулята в большой объем питательной среды может привести к диффузии из клеток витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов. Внесение большой дозы приводит к конкуренции за питательный субстрат внесенных организмов, что приводит к замедлению делений клеток [277]. К тому же, наращивание большей дозы инокулята экономически не выгодно, т.к. не всегда имеется промежуточный инокуляционный ферментер соответствующего объема, и даже при его наличии значительно увеличиваются трудозатраты.

В связи с этим следующим этапом данного исследования было определение оптимального количества необходимой дозы инокулята для роста и размножения бактерий *B. pumilus* В-13250, *B. toyonensis* В-13249. Исходная доза посевного материала составила 10%. Результаты ферментации приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Технологические показатели ферментации при дозе посевного материала 10%

Время пробы	Показатели <i>B. pumilus</i> B-13250				Показатели <i>B. toyonensis</i> B-13249			
	pH	Микроскопия	ОП	КОЕ/г в конц.	pH	Микроскопия	ОП	КОЕ/г в конц.
Среда до посева	6,80 (±0)	Отсутствие МКБ	0,420 (±0,020)		6,80 (±0)	Отсутствие МКБ	0,337 (±0,013)	
2 ч	6,83 (±0,03)	Одиночные палочки, мелкие	0,968 (±0,034)		6,95 (±0,21)	Одиночные толстые палочки, парами и одиночно	0,422 (±0,014)	
4 ч	7,15 (±0,23)	Палочки стали толще, их больше	1,756 (±0,081)		7,91 (±0,33)	Много цепочек	1,152 (±0,024)	
6 ч	7,82 (±0,02)	Много клеток	1,847 (±0,017)		8,32 (±0,12)	Большие цепочки, кучки	1,235 (±0,012)	
24 ч	7,92 (±0,03)	Споры, редко палочки	2,227 (±0,102)	1,31 (±0,04) × 10 ¹²	8,00 (±0,11)	Много спор, палочки с эндоспорами	2,088 (±0,102)	3,30 (±0,11) × 10 ¹¹

Выявили, что 10% посевного материала достаточно для достижения заданных технологических параметров: титр КОЕ/г сухого концентрата достигал значения $1,31(\pm 0,04) \times 10^{12}$ КОЕ/г у штамма *B. pumilus* B-13250 и $3,30(\pm 0,11) \times 10^{11}$ КОЕ/г у штамма *B. toyonensis* B-13249. Для оценки последствий снижения дозы посевного материала дополнительно оценили численность бактерий после 24-часовой ферментации при использовании 1 и 5,5% (рисунок 6).

Рисунок 6 – Влияние дозы инокулята на количество (КОЕ/г) *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249

При всех трех вариантах дозы посевного материала значение численности штамма *B. pumilus* B-13250 на момент окончания биотехнологического процесса достигало производственной необходимой степени ($1,0 \times 10^{11}$ КОЕ/г). Самый

высокий титр бактерий при дозе 5,5% ($4,42(\pm 0,22) \times 10^{12}$ КОЕ/г), но дальнейшее увеличение не давало положительных результатов ($1,31(\pm 0,05) \times 10^{12}$ КОЕ/г). В связи с этим даже 1% посевного материала достаточно для проведения производственного цикла работ с данным микроорганизмом. Это может быть связано с тем, что клетки исследуемого ризосферного штамма, попав в богатую питательными веществами среду, начинали размножаться с максимальной скоростью не зависимо от количества инокулята. Также, объема в 1% достаточно для активизации необходимых ферментных систем. Однако, при внесении высокой концентрации (10%) посевного материала, возможно наступала конкуренция за питательные вещества. Растущие клетки не получали оптимальных условий жизнедеятельности и количество биомассы снижалось. Таким образом, доза 1% инокулята обеспечивал наиболее экономически выгодные условия для включения в состав пробиотического препарата штамма *B. pumilus* B-13250.

При культивировании штамма *B. toyonensis* B-13249 отмечены аналогичные результаты: увеличение дозы посевного материала с 1 до 10% влияло на численность бактерий (КОЕ/г) в пределах 1–2 порядков, но всегда достигала степени 11. При этом доза инокулята в 5,5% давала максимальное количество КОЕ/г – $1,51(\pm 0,05) \times 10^{12}$. Также, объема в 1% достаточно для активизации необходимых ферментных систем.

При сравнении выхода биомассы исследуемых штаммов лучшие результаты получены на 10%-й дозе посевного материала (рисунок 7).

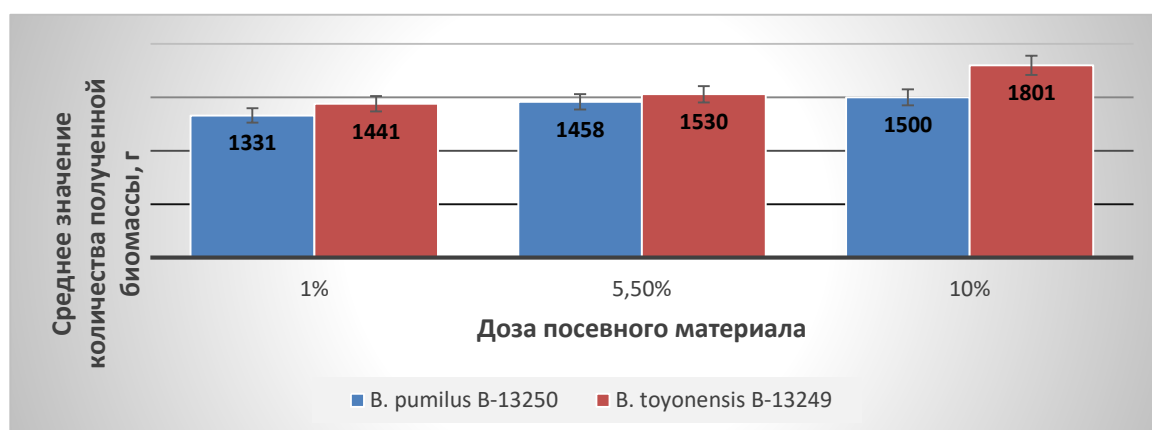


Рисунок 7 – Влияние дозы инокулята на накопление биомассы *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249, через 24 часа культивирования

Количество биомассы штамма *B. pumilus* B-13250 варьировало незначительно. При дозе посевного материала в 1% – 1331 (± 53) г, при дозе в 5,5% – 1458 (± 63) г, при дозе 10% – 1500 (± 45) г. Т.е. увеличение дозы посевного материала приводило к повышению биомассы, но незначительно, по сравнению с затратами на производство такой большой дозы.

При анализе полученной биомассы *B. toyonensis* B-13249 получены аналогичные результаты: при дозе посевного материала в 1% – 1441 (± 65) г, при дозе в 5,5% – 1530 (± 36) г и при дозе 10% – 1801 (± 72) г.

Использование 1 или 5,5% посевного материала с экономической точки зрения наиболее эффективно: уменьшается количество ферментаций и соответственно уменьшаются затраты на дополнительные питательные среды, электричество, рабочие часы сотрудников, количество анализов на контаминанты и общее сокращение времени производственного цикла, как минимум на 1 сутки (из расчета дополнительной 24 часовой ферментации в инокуляционном аппарате).

Таким образом, для наращивания биомассы обоих исследуемых штаммов наиболее оптимальной дозой инокулята явилась 5,5%, но для оптимизации технологических процессов, не теряя в качестве продукта, достаточно 1% [278].

3.2.1.3 Подбор температуры культивирования

Для биосинтеза каждого живого организма, в том числе споровых бактерий, требуется определенная температура, статирование которой влияет на накопление биомассы и достижение максимальной численности бактерий. Для изучения оптимальной температуры штаммы *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249 культивировали при одинаковых условиях: использовали шейкер-инкубатор «Innova 44» при заданных температурах ($^{\circ}\text{C}$) – 15, 25, 30, 37, 42, перемешивание – 250 об./мин, продолжительность культивирования – 24 ч. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, с заполнением 200 мл КЖ. Полученные результаты исследований представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Технологические показатели культивирования *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249 при разных температурных режимах

Температура культивирования, °C	<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)

Из представленных данных видно, что у обеих исследуемых культур отклонения водородного показателя pH при разных температурных режимах имели аналогичные значения: при установке 15 °C в варианте *B. pumilus* B-13250 с изначально выставленного 6,80 снизился до 6,64 (±0,09) и не поднялся за 24 ч культивирования, у штамма *B. toyonensis* B-13249 аналогично наблюдалось снижение и на момент снятия колбы в 24 ч был результат в 6,20 (±0,04). Эти данные говорили о слишком низкой температуре для роста данных микроорганизмов, что и подтверждалось значением ОП: в культуре *B. toyonensis* B-13249 – 0,513 (±0,022), в варианте *B. pumilus* B-13250 показатель ОП составлял всего 0,089 (±0,004).

При повышении температуры на 10 градусов (25 °C) показатели ОП обеих культур значительно улучшились: *B. pumilus* B-13250 – 0,429 (±0,017), *B. toyonensis* B-13249 – 0,533 (±0,012). Дальнейшее повышение температуры положительно влияло на показания ОП. Штамм *B. pumilus* B-13250 при установке температуры 30 °C по ОП повысился до 0,482 (±0,018), при установке 37 °C – до 0,574 (±0,017). У штамма *B. toyonensis* B-13249 показатели также росли вверх: при установке температуры 30 °C ОП повысился до 0,858 (±0,022), при установке 37 °C – до 0,995 (±0,012).

Повышение температуры до 42 °C негативно сказалось на росте обеих культур. У штамма *B. pumilus* B-13250 показатель ОП снизился до 0,311 (±0,015), у *B. toyonensis* B-13249 – до 0,370 (±0,013) (минимальное значение для данного штамма во всех экспериментах с температурным режимом). Данные показатели подтверждались количеством живых микроорганизмов (рисунок 8).

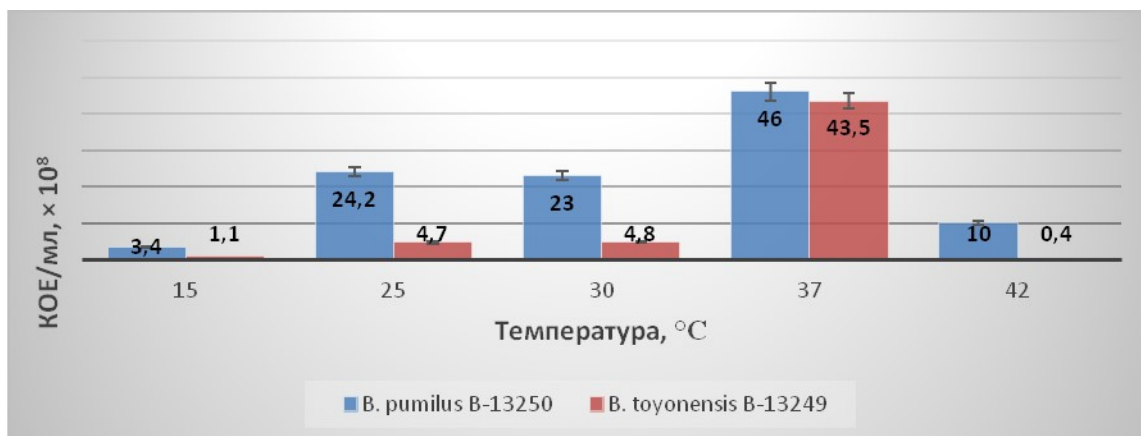


Рисунок 8 – Влияние температуры культивирования на количество *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249

Максимальный титр штамма *B. pumilus* B-13250 зафиксировали при температуре 37 °C – $4,60 (\pm 0,20) \times 10^9$ КОЕ/мл при ОП – $0,574 (\pm 0,017)$. Наименьшие показатели наблюдались при 15 ($3,40 (\pm 0,11) \times 10^8$ КОЕ/мл, ОП: $0,089 (\pm 0,004)$) и 42 ($1,00 (\pm 0,03) \times 10^9$ КОЕ/мл, ОП: $0,311 (\pm 0,015)$) °C культивирования. Следует отметить, что культура *B. pumilus* B-13250 росла интенсивно и набирала высокую численность при всех предложенных температурах культивирования, что подтвердило возможность включения данного микроорганизма в состав разрабатываемого пробиотического препарата.

Наибольшую численность штамма *B. toyonensis* B-13249 также зафиксировали при температуре 37 °C – $4,35 (\pm 0,19) \times 10^9$ КОЕ/мл при ОП – $0,995 (\pm 0,012)$. Наименьшие показатели также наблюдались при 15 ($1,05 (\pm 0,04) \times 10^8$ КОЕ/мл, ОП: $0,513 (\pm 0,022)$) и 42 ($3,95 (\pm 0,15) \times 10^7$ КОЕ/мл, ОП – $0,370 (\pm 0,013)$) °C культивирования. Таким образом, 15 °C – минимальный порог развития культуры *B. toyonensis* B-13249, что обусловлено низкой скоростью внутриклеточных процессов, соответственно низкой скоростью размножения; при температуре в 42 °C часть клеток претерпевала необратимые структурные изменения и гибла.

Однако, в состав препарата для аквакультур возможно включение обоих микроорганизмов. Кроме того, возможность развития используемых культур при отклонении от оптимальных температур обеспечивает перспективу использования данных штаммов на разных объектах аквакультур, при разных условиях их воспроизводства [279].

3.2.1.4 Подбор pH культивирования

Активная кислотность питательной среды влияет на скорость биохимических реакций в клетке, потребление субстратов и накопление биомассы. Из личного опыта, а также на основании современных литературных данных [68, 280–286] установлено, что значение pH в нейтральном положении (6,5–7,5) является благоприятным для роста *Bacillus*, поддержание заданного pH на благоприятном для клеток уровне, позволяет продлить фазу активного роста спорообразующих микроорганизмов. Установление оптимальной активной кислотности КЖ позволяет продлить период активного накопления биомассы в начале ферментации. При отсутствии поддержания значений активной кислотности в процессе роста быстро происходит закисление КЖ за счет экскретирования в среду метаболитов обмена клетки, что в итоге приводит к ингибированию роста клеток.

Для определения оптимальной активной кислотности среды, культивирование штаммов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 производили при одинаковых условиях: использовали шейкер-инкубатор «Innova 44», температура – 37 °С, количество оборотов – 250 об./мин, продолжительность культивирования – 24 ч. Исследуемые задаваемые значения pH: 5,6, 6,2, 6,8, 7,2. Культивировали в колбах Эрленмейера (500 мл), с заполнением 200 мл КЖ. Для корректирования значений pH среды использовали 20%-ый раствор гидроокиси натрия. Результаты исследований представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Технологические показатели культивирования *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 при разных значениях pH

Уста- вка pH	<i>B. pumilus</i> В-13250				<i>B. toyonensis</i> В-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)

После первого часа культивирования у обоих штаммов, практически, во всех исследуемых вариантах, показатель активной кислотности понижался, за исключением изначально сверхнизкого – 5,6, поэтому производили корректировку кислотности в вариантах 6,2, 6,8, 7,4 путем добавления стерильного раствора едкого натра до первоначально заданной отметки.

Через 4 часа культивирования показатели штамма *B. pumilus* В-13250 в варианте со значением рН в 5,6 также не изменились. В вариантах с исходными значениями рН 6,2, 6,8, 7,4 наблюдали повышение уровня кислотности, при этом в вариантах со значениями предустановок 6,8 и 7,4 кислотность увеличилась существенно: 6,8 до 5,99 ($\pm 0,03$); 7,4 – 6,43 ($\pm 0,04$). Это косвенно свидетельствовало о том, что при данных значениях рН культура развивалась активнее (что подтверждалось микроскопией и ОП) и окисляющих продуктов обмена выделяла больше.

У штамма *B. toyonensis* В-13249 сдвиг в кислую сторону рН произошел во всех вариантах установок, включая и изначально низкую – с 5,6 до 5,20 ($\pm 0,03$). Наибольшее отклонение произошло при установке 7,4 до 6,28 ($\pm 0,12$), что само по себе больше целого значения в единицу (1,12 ($\pm 0,12$)), что тоже соответствовало наиболее подходящим условиям жизни данной культуры.

После измерений корректировали значения рН до изначально заданных, колбы снова ставили в шейкер-инкубатор и оставляли без последующего контроля кислотности (до прошествия 24 часов культивирования). Через 24 часа, по окончанию эксперимента, колбы снимали и замеряли конечные значения показателей.

При окончании культивирования показатель рН у обеих культур был в нейтральных значениях, самый низкий показатель зафиксировали у *B. pumilus* В-13250 при рН 5,6 – 6,69 ($\pm 0,15$), это говорило, что параметры оптимального роста культуры стремились в нейтральное положение, только при корректировке в 5,6 требовалось длительное время и складывались неблагоприятные условия для оптимального роста. Наибольшее значение рН было у *B. toyonensis* В-13249 при установке в 7,4 – 7,32 ($\pm 0,11$), что в свою очередь, говорило о том, что значение

установки в 7,4 также не благоприятно сказывалось для роста культуры и микроорганизмы стремились понизить задаваемое значение.

Наибольшая плотность наблюдалась в варианте с $\text{pH}=6,8$ у обеих исследуемых культур. Штамм *B. pumilus* B-13250 – $0,849 (\pm 0,040)$, что на 0,2 значения выше от ближайшего в установке 7,4 ($0,628 (\pm 0,029)$). Аналогичные данные и у культуры *B. toyonensis* B-13249: при установке pH в 6,8 значение ОП – $0,991 (\pm 0,036)$ значительно больше ближайшего значения – $0,759 (\pm 0,026)$, как ни странно, получившемся при установке в 5,6, что могло объясняться более продолжительным временем для восстановления кислотности среды.

Из полученных данных видно, что на 24 ч роста значение активной кислотности стремилось к нейтральному положению, и в вариантах 5,6, 6,2, 6,8 значение pH в обоих исследуемых штаммов переросло изначально заданный уровень. При установке же 7,4 лишь в некоторых повторностях у *B. toyonensis* B-13249 значение, незначительно (на 0,01), превышало задаваемый параметр. В исследованиях *B. pumilus* B-13250 значение в 7,4 не достигалось ни разу. Оптимальный pH для выращивания исследуемых культур находится в стандартном для бактерий пределе нейтрального положения. Количество живых клеток (КОЕ/мл) при разных установках pH представлено на рисунке 9.

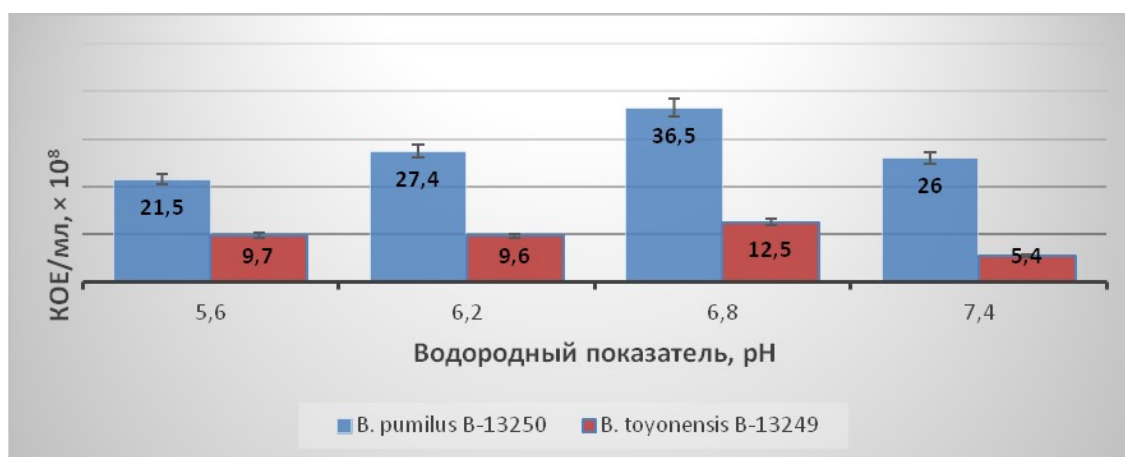


Рисунок 9 – Влияние кислотности среды культивирования на количество *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249

Наибольшее количество живых клеток обнаружили при культивировании штаммов на среде с $\text{pH}=6,8$: *B. pumilus* B-13250 – $3,65(\pm 0,18) \times 10^9$, *B. toyonensis* B-13249 – $1,25(\pm 0,05) \times 10^9$. При этом, наименьшие значения у штамма *B. pumilus* B-

13250 – $2,15(\pm 0,10) \times 10^9$ наблюдали при pH среды 5,6, а у *B. toyonensis* B-13249 – $5,40(\pm 0,13) \times 10^8$ при pH среды 7,4.

Таким образом, для глубинного культивирования обоих исследуемых штаммов оптимальный вариант pH среды, равный 6,8, что подтверждается и литературными данными [287]. Но следует отметить, что при всех исследуемых установках активной кислотности среды, культуры микроорганизмов сохраняли жизнеспособность и ни в одном эксперименте не наблюдалось массовой гибели. Возможность развития изучаемых культур при разных pH предполагает расширение диапазона использования подобных пробиотических препаратов.

3.2.1.5 Подбор времени культивирования

Важным экономическим показателем процесса ферментации является время культивирования. Для определения оптимального времени глубинного культивирования оба штамма (*B. pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249) ферментировали при одинаковых условиях: для получения посевного материала использовали шейкер-инкубатор «Innova 44», температура – 37 °C, pH=6,8, количество оборотов – 250 об./мин, продолжительность культивирования – 24 ч. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, с заполнением 200 мл культуральной жидкости. Перед посевом ферментера, посевную культуру проверяли на чистоту, морфологическую принадлежность каждой выращиваемой культуры, активную кислотность. При условии получения положительных результатов данных тестов, инокулят передавали для посева ферментера. Посев ферментационного аппарата осуществляли после проведения анализа среды на отсутствие контаминации в самом аппарате. В качестве основной ферментационной среды в биореакторе использовали состав МК-ОС. Готовым посевным материалом в объеме 1 л (10% от объема среды в ферментере) сеяли аппарат 15 л объемом (с загруженной ферментационной средой объемом 10 л). Основные показатели ферментации представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Технологические показатели культивирования *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249

	<i>B. pumilus</i> B-13250			<i>B. toyonensis</i> B-13249		
Время взятия пробы	Уровень рН	Характеристика культуры	ОП	Уровень рН	Характеристика культуры	ОП
Среда до посева	6,80 ($\pm 0,0$)	Отсутствие посторонних организмов	0,420 ($\pm 0,015$)	6,80 ($\pm 0,0$)	Отсутствие посторонних организмов	0,337 ($\pm 0,013$)
2 ч	6,83 ($\pm 0,03$)	Одиночные палочки, мелкие	0,968 ($\pm 0,024$)	6,95 ($\pm 0,21$)	Одиночные толстые палочки, парами и одиночно	0,422 ($\pm 0,014$)
4 ч	7,15 ($\pm 0,23$)	Много мелких палочек	1,756 ($\pm 0,081$)	7,91 ($\pm 0,33$)	Много цепочек	1,152 ($\pm 0,024$)
6 ч	7,82 ($\pm 0,02$)	Много палочек	1,847 ($\pm 0,017$)	8,32 ($\pm 0,12$)	Большие цепочки палочек, кучки	1,235 ($\pm 0,012$)
8 ч	7,90 ($\pm 0,02$)	Много палочек, начало спорообразовани я	2,015 ($\pm 0,051$)	8,41 ($\pm 0,02$)	Много палочек, начали внутри образовываться споры	1,507 ($\pm 0,040$)
24 ч	7,92 ($\pm 0,03$)	Много спор, палочки с эндоспорами	2,227 ($\pm 0,102$)	8,00 ($\pm 0,11$)	Много спор, палочки с эндоспорами	2,088 ($\pm 0,092$)
26 ч	7,65 ($\pm 0,12$)	Много спор	2,381 ($\pm 0,055$)	8,11 ($\pm 0,02$)	Много спор	2,255 ($\pm 0,042$)
28 ч	7,41 ($\pm 0,22$)	Много спор	2,427 ($\pm 0,013$)	7,98 ($\pm 0,23$)	Много спор	2,463 ($\pm 0,022$)
30 ч	7,12 ($\pm 0,15$)	Споры	2,532 ($\pm 0,003$)	7,73 ($\pm 0,34$)	Споры	2,480 ($\pm 0,034$)
48 ч	7,59 ($\pm 0,11$)	Споры	2,506 ($\pm 0,043$)	8,81 ($\pm 0,42$)	Споры, одиночные палочки	2,574 ($\pm 0,114$)
72 ч	7,42 ($\pm 0,09$)	Споры и одиночные клетки	2,587 ($\pm 0,022$)	8,41 ($\pm 0,27$)	Споры	2,552 ($\pm 0,122$)
Супер- натант		Встречаются одиночные палочки	0,764 ($\pm 0,021$)		Встречаются одиночные палочки	0,314 ($\pm 0,013$)

Обе исследуемые культуры микроорганизмов, практически сразу, после внесения инокулята в основную ферментационную среду начинали активно питаться и размножаться, что подтверждали очень короткой лаг-фазой и минимальным смещением водородного показателя в сторону понижения, на протяжении первых двух часов, а также незамедлительно интенсивно растущим показанием ОП до 24 часов, включительно. На момент 24 часов культивирования ОП *B. pumilus* B-13250 составляла 2,227 ($\pm 0,102$), ОП *B. toyonensis* B-13249 – 2,088

($\pm 0,092$). Лаг-фаза начиналась сразу после внесения в среду посевного материала с титром $2,45(\pm 0,12) \times 10^9$ КОЕ/мл у штамма *B. pumilus* B-13250 и $5,90(\pm 0,25) \times 10^9$ КОЕ/мл у штамма *B. toyonensis* B-13249 и продолжалась около 1–2 часов у обоих организмов. Далее наступала фаза экспоненциального роста, что подтверждалось накоплением численности бактерий (рисунок 10).

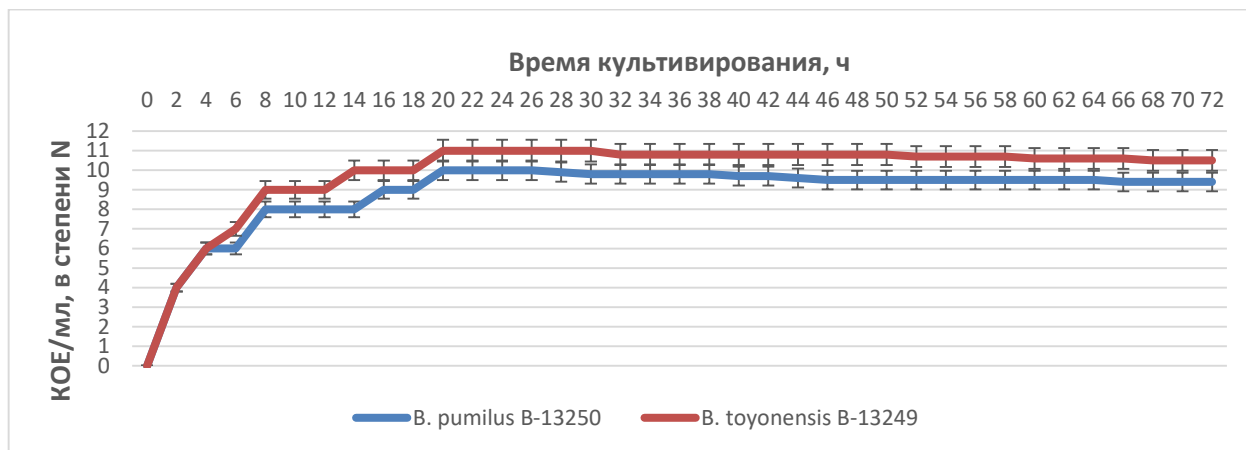


Рисунок 10 – Накопление количества микроорганизмов (КОЕ/мл) в течении 72 часов культивирования

Данный факт можно объяснить правильно подобранными питательными средами: как инокуляционной, так и основной ферментационной. Микроорганизмам не приходилось адаптироваться к сложным источникам питательных веществ, и они быстро перестроили метаболизм на предлагаемые субстраты. Оба штамма перешли в спорообразное состояние и дальнейшее их выращивание происходило без выхода из спор. На протяжении последующих суток культивирования ОП росла незначительно.

К 24 часам ферментации отмечена наиболее высокая численность бацилл: $8,20(\pm 0,40) \times 10^{10}$ КОЕ/мл у штамма *B. pumilus* B-13250 и $3,05(\pm 0,15) \times 10^{11}$ КОЕ/мл у штамма *B. toyonensis* B-13249. Экспоненциальная фаза была зафиксирована для обоих штаммов в период от 2 до 18–20 часов. Начиная с 20–24 часов культивирования наступала стационарная фаза. Через 48 часов культивирования численность бактерий незначительно снижалась: у *B. pumilus* B-13250 – $6,30(\pm 0,21) \times 10^{10}$ КОЕ/мл, у *B. toyonensis* B-13249 – $4,15(\pm 0,15) \times 10^{11}$ КОЕ/мл, и дальнейшая тенденция к снижению в пределах порядка сохранилась и на 72 часа

культивирования: *B. pumilus* В-13250 – $3,90(\pm 0,13) \times 10^{10}$ КОЕ/мл, *B. toyonensis* В-13249 – $3,20(\pm 0,12) \times 10^{11}$ КОЕ/мл.

Таким образом оптимальным временем культивирования для максимального накопления биомассы спорообразующих бактерий *B. toyonensis* В-13249 является 24–26 часов, *B. pumilus* В-13250 – 22–26 часов. При этом на момент 24 часа численность живых бактерий в обоих случаях была достаточна для осуществления технологического процесса. При дальнейшем культивировании количество микробов менялось незначительно, что вероятнее всего связано с тем, что питательные элементы среды поглощены, а для продолжения ферментации необходимо добавление подпиточной среды, что в свою очередь удорожало производство введением концентрированных компонентов, увеличением времени.

3.2.2 Разработка технологии получения готовой формы препарата

Процесс получения готовой формы препарата явился последующим технологическим звеном. Основные этапы производства нового пробиотического препарата отражены на рисунке 11.

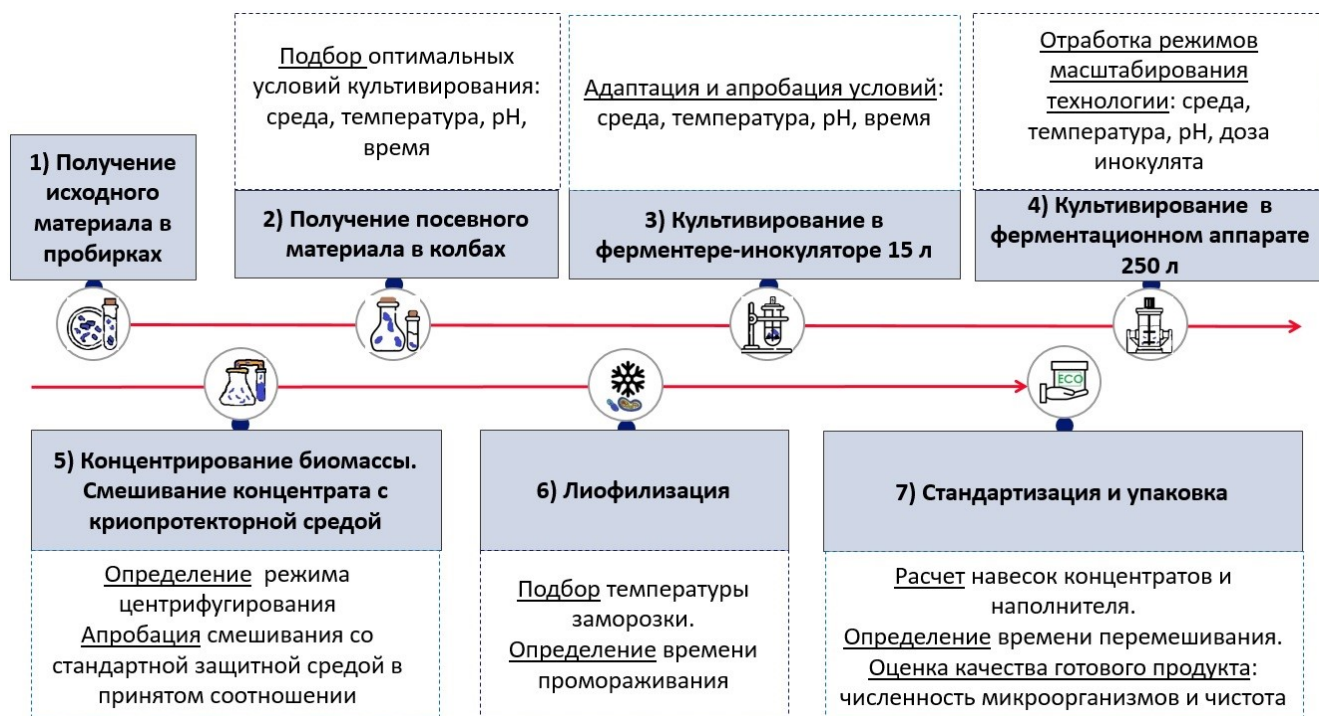


Рисунок 11 – Схема эксперимента. Этапы 1–6 реализовались для каждого штамма отдельно

Разработку методик концентрирования, лиофилизации и стандартизации проводили на лабораторном и опытно-промышленном оборудовании.

3.2.2.1 Концентрирование культуральной жидкости

Для разработки метода отделения бактериальных клеток использовали высокоскоростную проточную центрифугу GTGQ-1251 со следующими техническими характеристиками: диаметр ротора – 125 мм, объем ротора – 8 л, максимальное количество оборотов – 15000 об./мин, максимальная производительность – 1500 л/ч.

На стадии ферментации получили КЖ, содержащие бактерии штаммов *B. pumilus* B-13250 или *B. toyonensis* B-13249 (таблица 10).

Таблица 10 – Характеристика КЖ *B. pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249

Наименование параметров	Показатели <i>B. pumilus</i> B-13250	Показатели <i>B. toyonensis</i> B-13249
Активная кислотность, pH	7,89 ($\pm 0,19$)	8,48 ($\pm 0,41$)
Содержание жизнеспособных клеток, не менее, 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

По своим характеристикам КЖ обоих штаммов сходны, поэтому изучили одинаковые режимы центрифугирования при максимальных оборотах (15000), с наименьшей по диаметру форсункой (3 мм) для обеих культур. При этом варьировали скоростью потока от 70 л/час до 150 л/час. Полученные результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Характеристика нативного раствора при изменении скорости потока

	Нативный раствор <i>B. pumilus</i> B-13250		Нативный раствор <i>B. toyonensis</i> B-13249	
Ск-сть, л/ч	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	$5,70(\pm 0,25) \times 10^3$

Следует указать, что при скорости 130 л/ч в нативном растворе под микроскопом обнаруживали единичные клетки бактерий, при этом визуально жидкость была прозрачной у обеих исследуемых культур. По мере увеличения скорости потока появлялось помутнение, что говорило об увеличении количества проскочивших бактериальных клеток в супернатанте. Хорошее разделение КЖ обеспечивалось при скорости протока от 70 л/час до 120 л/час. Оптимальной же скоростью потока, ввиду оптимизации технологических процессов, а также сокращения их времени, считаем – от 100 л/час до 130 л/час. Характеристика полученных концентратов бактериальных клеток приведена в таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика концентрата бактерий

Наименование параметра	Показатели <i>B. pumilus</i> B-13250	Показатели <i>B. toyonensis</i> B-13249
Содержание жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	$9,05(\pm 0,40) \times 10^{10}$	$8,90(\pm 0,40) \times 10^{10}$
Влажность биомассы, %	80 (± 4)	80 (± 4)
Количество с цикла на 250 л аппарате, кг	2,05 ($\pm 0,10$)	2,33 ($\pm 0,10$)

3.2.2.2 Высушивание концентрированной биомассы

Процесс сублимационной (лиофильной) сушки по своей природе представляет собой обезвоживание замороженного материала в результате перехода вещества из твердой фазы (льда) в газообразное состояние, минуя жидкую фазу. Этот этап исследовательской работы выполняли с использованием лабораторной лиофильной сушилки Epsilon 1-4LSCplus, в дальнейшем, выбранный технологический режим сушки адаптировали на полупромышленную сушку SP Scientific 25L Genesis SQ Super ES-55 (для высушивания концентрата из 250 л аппарата). Перед началом сушки полученный на стадии центрифугирования концентрат бактериальных клеток смешивали с криопротекторной средой в соотношении 1:1, перемешивали, заливали в лотки слоем 1–1,5 см и замораживали.

Для установления оптимальной температуры замораживания концентрата было проверено 5 вариантов температур, начиная от $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (стандартная температуру бытовых морозильных камер), до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (щадящая температура заморозки полок сублиматора) с экспозицией 8 часов. После чего производили высушивание согласно предустановленной программе лиофильной сушки. По

окончании сушки в готовом сухом препарате определяли количество жизнеспособных клеток (рисунок 11).

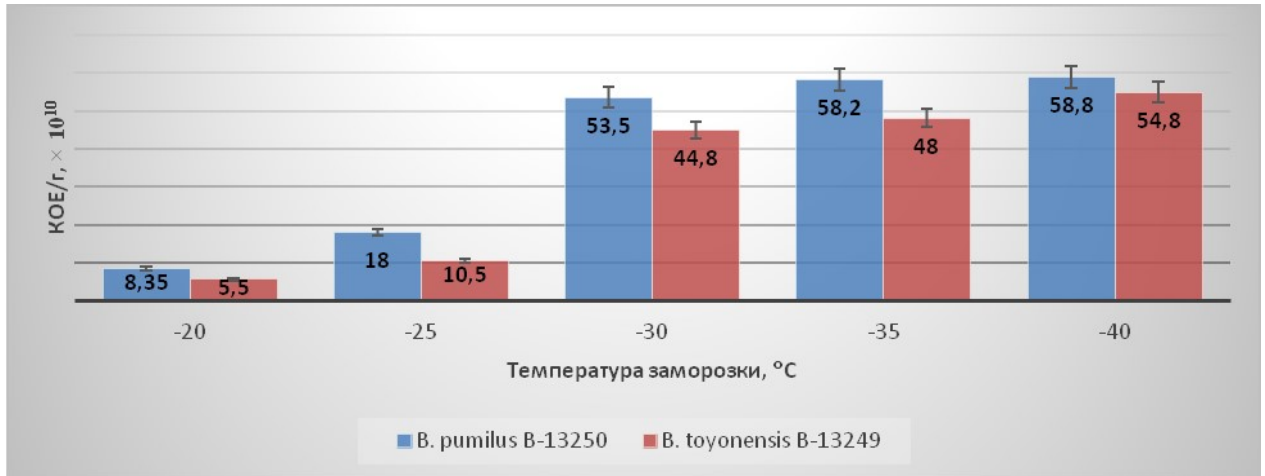


Рисунок 11 – Влияние температуры замораживания на количество жизнеспособных клеток в сухом концентрате

Из данных диаграммы можно заметить, что для получения максимальной выживаемости бактериальных клеток при сушке, оптимальным является замораживание в течение 8 часов при температуре от -30 до -40 °C, что возможно делать в камере сублиматора. Только при температуре замораживания -20 °C, численность живых микроорганизмов снизилась на один порядок, использование других температур не повлияло на численность микроорганизмов.

В условиях реального биотехнологического производства, из-за занятости сушки, возникает потребность в установлении оптимального времени замораживания при различных температурах. Достижение максимально низких температур является процессом, во-первых, энергозатратным, во-вторых, при отсутствии кельвинатора, либо места на полках сублиматора, является целесообразным использовать имеющиеся бытовые морозильники, с более высокой температурой, но с более продолжительным временем промораживания. Для решения данной задачи провели ряд опытов, при которых замораживание бактериальных концентратов осуществляли при разных температурах: от -20 до -30 °C с шагом 5 °C и временных промежутках промораживания: 8, 10, 12, 14 часов. Полученные результаты представлены на рисунке 12.

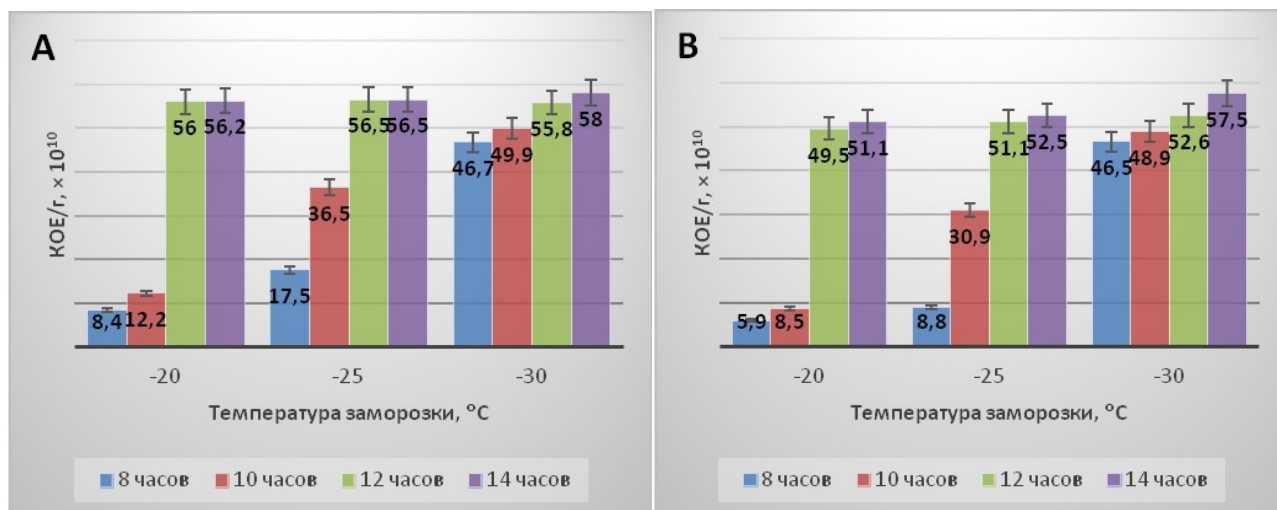


Рисунок 12 – Влияние режима замораживания на количество микроорганизмов в сухом концентрате: А – *B. pumilus* B-13250, КОЕ/г; В – *B. toyonensis* B-13249, КОЕ/г

Из представленных результатов видно, что штамм *B. pumilus* B-13250 при увеличении времени заморозки до 12–14 часов при температуре –20–25 °C достигает максимальной выживаемости клеток (рисунок 12А). Штамм *B. toyonensis* B-13249 также при увеличении времени заморозки до 12–14 часов при температуре – 20–25 °C достигает максимальной выживаемости клеток (рисунок 12В). Как и предполагалось, при более коротком времени и повышенных температурах до –20 °C, в целом, выживаемость падает всего на один порядок. Данные показатели достигались за счет защитных форм микроорганизмов – спор, а также правильного состава и соотношения смешивания с криопротекторной средой.

Таким образом, определили 2 режима замораживания для достижения максимальной выживаемости клеток бактерий обеих культур микроорганизмов: заморозка до –30/–40 °C на полках сублиматора, либо более продолжительный режим около 12–14 часов в морозильном ларе при – 20–25°C.

После завершения процесса сублимационной сушки, температуру в материале повышали до положительных значений – этап досушивания, который являлся конечной стадией лиофильного высушивания. Во время процесса досушки из биомассы концентрата удалялась оставшаяся вода до конечных значений остаточной влажности продукта. Контрольное время работы предустановленной автоматической программы по сушке составляло 39 ч и 50 мин, после чего сушилка переходила в бесконечный этап досушки при температуре полок +25 °C.

Определение конкретного времени досушки не производили, так как слой в лотке, плотность биоматериала, а также остаточное количество пеногасителя в структуре биомасс, не всегда принимало одинаковые значения. Важным отслеживаемым параметром была разница температур между полкой и самим биоматериалом. При единых значениях температур в $\pm 0,5$ °C от +25 °C, по итогу проведения экспериментов, доля остаточной влажности в концентрате не превышала 3–4%. Основные параметры программы лиофильной сушки приведены в таблице 13.

Таблица 13 – Режим лиофильной сушки концентрата спорообразующих бактерий Epsilon 1-4LSCplus

Этап	Действие
Остужение полки	Охлаждение полки до –35 °C
Заморозка	Замораживание продукта до –35 °C; Охлаждение конденсора до –45 °; Набор вакуума 220 мбар.
Первичный цикл сушки	1. Быстрый прогрев до –35 °C в течение 10 минут. 2. Выдержка (медленный прогрев) при –20 °C в течение 300 минут. 3. Выдержка (медленный прогрев) при –15 °C в течение 300 минут. 4. Выдержка (медленный прогрев) при –10 °C в течение 300 минут. 5. Выдержка (медленный прогрев) при 0 °C в течение 300 минут. 6. Выдержка (медленный прогрев) при +10 °C в течение 300 минут. 7. Выдержка (медленный прогрев) при +20 °C в течение 300 минут. 8. Выдержка (медленный прогрев) при +20 °C в течение 300 минут.
Дополнительная сушка	1. Набор вакуума до 0,010 мбар, выдержка +20 °C в течение 10 минут. 2. Медленный прогрев до +25 °C при 0,010 мбар в течение 120 минут. 3. Выдержка при +25 °C, 0,010 мбар в течение 120 минут.

После анализа результатов экспериментов по высушиванию на лабораторной лиофильной сушке Epsilon 1-4LSCplus, для дальнейшей апробации и внедрения в производственный процесс подобного алгоритма, приняли решение о настройке аналогичной программы сушки микроорганизмов на полупромышленной сушке SP Scientific 25L Genesis SQ Super ES-55.

Время работы автоматической программы по сушке Epsilon 1-4LSCplus составляло 39 ч и 50 мин, при написании аналогичной программы для полупромышленной сушки, первоначально, не учитывали скорость и время набора вакуума и охлаждения большего объема, при перерасчете основных 5 часовых шагов, во внимание брали быстрые переходы, по итогу время режима самой сушки сократили до 32 ч 30 мин, но с учетом объема промышленной сушки, затраты времени на дополнительные этапы, общее время высушивания биомассы

концентратов получилось также, около 40 часов. По итогу апробации аналогичной программы, доля остаточной влажности в концентрате не превышала 3–4%. Основные параметры программы лиофильной сушки приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Режим лиофильной сушки концентрата спорообразующих бактерий на SP Scientific 25L Genesis SQ Super ES-55

Этап	Действие
Заморозка	Заморозка продукта до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$; Время выдержки – 10 минут; Охлаждение конденсора до -45 ° ; Набор вакуума 280 миллиторр.
Первичный цикл сушки	1. Быстрый прогрев до $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут. 2. Прогрев до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут. 3. Выдержка (медленный прогрев) при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 280 минут. 4. Быстрый прогрев до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут. 5. Выдержка (медленный прогрев) при $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 280 минут. 6. Быстрый прогрев до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут. 7. Выдержка (медленный прогрев) при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 280 минут. 8. Быстрый прогрев до $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут. 9. Выдержка (медленный прогрев) при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 280 минут. 10. Быстрый прогрев до $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут. 11. Выдержка (медленный прогрев) при $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 280 минут. 12. Быстрый прогрев до $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут. 13. Выдержка (медленный прогрев) при $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 280 минут.
Вторичная сушка	При температуре $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 130, понижение вакуума до 220 миллиторр.
Досушивание	При температуре $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$, уровень вакуума 220 миллиторр, время ∞ , до момента выключения.

В итоге проделанной работы установили, что в камере сублиматора концентрат бацилл необходимо замораживать в течение 8 часов при температуре $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, либо заморозку производить в морозильной камере не менее 12 часов при температуре $-20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

После завершения сушки из лотков вынимали сухие бактериальные концентраты, проверяли их на чистоту и численность живых бацилл и отправляли на этап стандартизации готового продукта.

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

Одним из способов увеличения экономической эффективности микробного производства, является совместное культивирование бактерий. Несмотря на то, что

тема не является новой, описанных в литературе работ по сокультивированию микроорганизмов не так много [295, 296]. Подобные исследования проводились и с бактериями рода *Bacillus* [297].

Условия проведения совместного культивирования штаммов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 на МК-ОС были такие же, как и при раздельном (см. 3.2.1.1). Результаты исследования представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Влияние способа культивирования на показатели ферментации

Штаммы	ОП по часам роста				рН по часам роста			
	2	4	6	24	2	4	6	24
<i>B. toyonensis</i> В-13249	0,982 ($\pm 0,041$)	1,564 ($\pm 0,073$)	1,533 ($\pm 0,063$)	1,534 ($\pm 0,062$)	6,97 ($\pm 0,26$)	8,29 ($\pm 0,08$)	8,61 ($\pm 0,06$)	8,79 ($\pm 0,34$)
<i>B. pumilus</i> В-13250	0,761 ($\pm 0,034$)	1,463 ($\pm 0,065$)	1,673 ($\pm 0,063$)	2,152 ($\pm 0,094$)	6,90 ($\pm 0,07$)	7,45 ($\pm 0,11$)	7,63 ($\pm 0,30$)	8,07 ($\pm 0,16$)
<i>B. toyonensis</i> В-13249 + <i>B. pumilus</i> В-13250	0,782 ($\pm 0,027$)	1,202 ($\pm 0,038$)	1,642 ($\pm 0,072$)	1,444 ($\pm 0,030$)	7,09 ($\pm 0,02$)	7,54 ($\pm 0,33$)	7,73 ($\pm 0,04$)	8,67 ($\pm 0,04$)

В процессе совместного культивирования значения рН и ОП закономерно росли, вплоть до 24 ч. При этом к 20–24 часам культивирования и у *B. toyonensis* В-13249 у обоих штаммов заканчивался процесс спорообразования и вегетативных клеток фактически не оставалось. По микроскопии визуально отмечалась разница в морфологии бактериальных клеток: длина и диаметр палочек *B. toyonensis* В-13249 больше, чем *B. pumilus* В-13250 (рисунок 13).

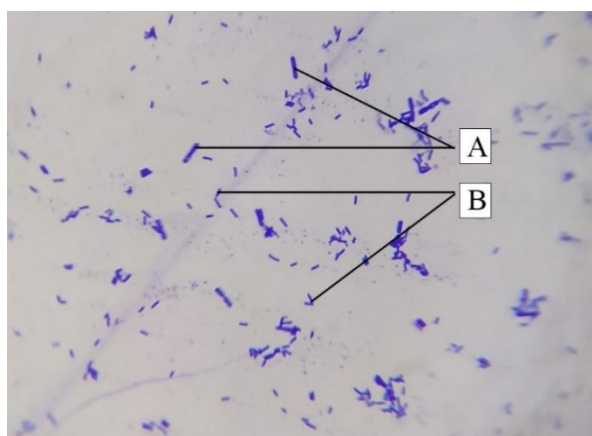


Рисунок 13 – Морфология бацилл в пробе через 6 часов совместного культивирования, $\times 1000$:
А – штамм *B. toyonensis* В-13249; В – штамм *B. pumilus* В-13250

После центрифугирования оба штамма легко отделялись, не слипались и соответствовали своим первоначальным морфологическим и физиологическим

характеристикам. Оба штамма легко перенесли сушку и их общий титр составлял $4,36(\pm 0,14) \times 10^{11}$ КОЕ/г в сухом концентрате (таблица 16).

Таблица 16 – Численность бацилл в технологическом цикле

Штамм	Титр с ферментера, КОЕ/мл	Титр высушенного концентрата, КОЕ/г	Масса концентрата, г
<i>B. toyonensis</i> B-13249	$1,21(\pm 0,03) \times 10^9$	$3,05(\pm 0,11) \times 10^{11}$	90,95 ($\pm 4,17$)
<i>B. pumilus</i> B-13250	$1,83(\pm 0,09) \times 10^{11}$	$2,66(\pm 0,12) \times 10^{11}$	151,28 ($\pm 6,06$)
В консорциуме: <i>B. toyonensis</i> B-13249	$3,95(\pm 0,10) \times 10^{10}$	$4,36(\pm 0,14) \times 10^{11}$	118,65 ($\pm 4,95$)
В консорциуме: <i>B. pumilus</i> B-13250	$3,10(\pm 0,15) \times 10^{10}$		
Общий: <i>B. toyonensis</i> B-13249 + <i>B. pumilus</i> B-13250	$6,71(\pm 0,30) \times 10^{10}$		

На МК-ОС исследованные штаммы дорастали до высокой численности как при раздельном, так и совместном культивировании. Численность живых бацилл на момент окончания ферментации не опускалась ниже 1×10^9 КОЕ/мл. После окончания процесса сушки численность бактерий возрастала еще на 1–2 порядка (*B. toyonensis* B-13249: при монокультивировании титр КОЕ/мл в ферментере $1,21(\pm 0,03) \times 10^9$, после сушки – $3,05(\pm 0,11) \times 10^{11}$ КОЕ/г; при сокультивировании $3,95(\pm 0,10) \times 10^{10}$ КОЕ/мл с ферментера, после сушки $3,62(\pm 0,14) \times 10^{11}$ КОЕ/г. *B. pumilus* B-13250: при монокультивировании титр КОЕ/мл в ферментере незначительно разнился с высушенным концентратом в пределах одного порядка, но при сокультивировании в ферментере дорастал до $3,10(\pm 0,15) \times 10^{10}$ КОЕ/мл, после сушки же КОЕ/г – $4,20(\pm 0,11) \times 10^{11}$.

При посеве высушенного бактериального концентрата вырастали колонии двух видов: *B. pumilus* B-13250 образовывал округлые колонии, равной формы, белого цвета, приподнятые, матовые, со складчатой каймой; *B. toyonensis* B-13249 – колонии мутно-белого цвета, с блеском, приподнятые, с неровным краем (рисунок 14).

Количество каждого штамма *Bacillus* spp. в консорциуме составило не менее 2×10^{10} КОЕ/г, минимальный титр готового лиофилизированного концентрата – $3,48 \times 10^{11}$ КОЕ/г (таблица 16).

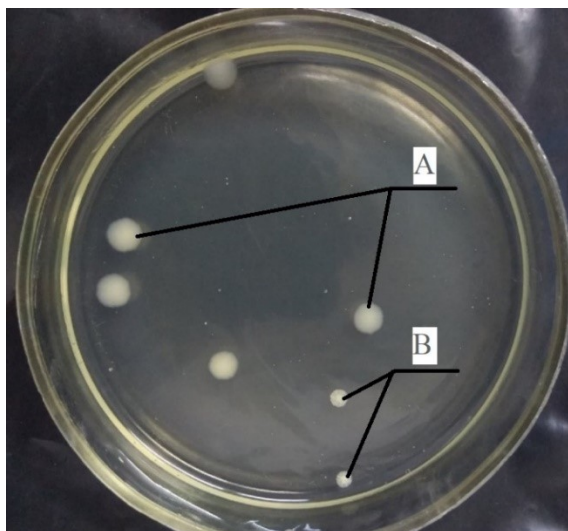


Рисунок 14 – Морфология колоний бацилл из концентрата, полученного совместным культивированием: А – колонии *B. toyonensis* В-13249; В – колонии *B. pumilus* В-13250

Таким образом, итоговая численность *B. pumilus* В-13250 в ходе отдельного и совместного культивирования как в пробах с ферментационной среды, так и после сушки оставалась постоянно высокой и не опускалась ниже $1,54 \times 10^{10}$ КОЕ/г. Численность же *B. toyonensis* В-13249 в пробах из ферментера при совместном культивировании становилась на порядок выше – с $1,21(\pm 0,03) \times 10^9$ до $3,95(\pm 0,10) \times 10^{10}$ КОЕ/мл.

Полученные результаты доказали возможность совместного культивирования таких разных видов, как *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 [249].

3.2.2.4 Разработка метода стандартизации препарата

Стандартизацию препарата проводили в смесителе СМУ-ПБ-200: смеситель сыпучих компонентов периодического действия типа «пьяная бочка», предназначенный для тщательного смешивания с сохранением структуры сыпучих продуктов при относительно небольшом расходе энергии и малом времени смешивания.

Каждая партия сухого концентрата может отличаться от последующих, количеством жизнеспособных клеток бактерий. Стандартизацию препарата до

заданных параметров проводили, ориентируясь на численность КОЕ/г сухих концентратов, пропорционально рассчитывая долю масс концентратов по отношению к массе наполнителя – мальтодекстрина. При смешивании сухого концентрата с наполнителем было необходимо, чтобы препарат и наполнитель имели приблизительно одну и ту же степень дисперсности, и влажность не более 5%. Выбор наполнителя, определение дозировки, необходимых условий хранения и длительности сохранения активности осуществляли экспериментально. Для спорообразующих бактерий выбрали мальтодекстрин.

Мальтодекстрин в совокупности с защитной средой (желатин + сахароза) явились прекрасной стартовой питательной средой для размножения бацилл при внесении в емкости для выращивания объектов аквакультур. Количество наполнителя можно также рассчитать по формуле:

$$S = a \times b \div c - b, \quad (5)$$

где: S – количество наполнителя, необходимое для получения стандартного по активности препарата, кг;

a – количество жизнеспособных клеток в исходном концентрате, КОЕ/г;

b – количество исходного концентрата, кг;

c – стандартное количество жизнеспособных клеток в концентрате, КОЕ/г.

После внесения в бочку смесителя определенного количества баконцентрата и расчетного количества наполнителя – мальтодекстрина, запускали процесс перемешивания для получения однородной массы готового пробиотического препарата.

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.

3.3 Характеристика полученного пробиотического препарата для аквакультур

Характеристика разработанного пробиотического препарата для аквакультур представлена в таблице 17.

Таблица 17 – Характеристика полученного в опытно-промышленных условиях пробиотического препарата для аквакультур

Наименование показателя	Значение показателя	Метод Анализа
Внешний вид	Порошок, состоящий из наполнителя – мальтодекстрина и лиофильно высушенного препарата спорообразующих 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 [288]
Количество жизнеспособных клеток <i>B. pumilus</i> B-13250, <i>B. toyonensis</i> B-13249, КОЕ/г, не менее	1×10^{10}	ГОСТ 31928-2013 [289]
Токсичность	Не токсичный	ГОСТ 31674-2012 [290]
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 [291]

Таким образом разработан новый пробиотический препарат на основе микроорганизмов *B. pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249 [293, 294]. На данный препарат разработана и утверждена первичная научно-техническая документация: ТУ 10.92.10-001-02067818-2022 (приложение 6) и ТИ (приказ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет №589/п, приложение 7), каталожный лист №007923, декларация о соответствии №РОСС RU Д-RU.PA01.B.30662/22 (приложение 8), получен патент (приложение 9).

3.3.1 Учет общей численности живых клеток *B. pumilus* В-13250, *B. toyonensis* В-13249 в готовом препарате и его микроскопический контроль

Для определения численности и чистоты концентратов бацилл и готового препарата их восстанавливали следующим образом: 5 г концентрата/препарата растворяли в колбе с 50 мл стерильной дистиллированной воды и отправляли в качалку на 30–40 минут для регидратации. Для дальнейшего исследования применяли чашечный метод Коха. Колонии бацилл из лифолизированных концентратов представлены на рисунке 15.

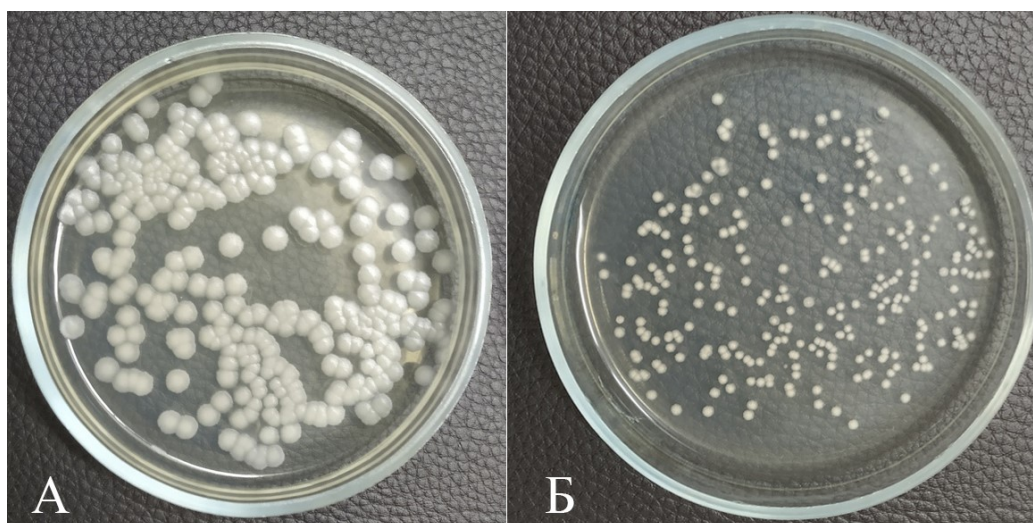


Рисунок 15 – Внешний вид колоний бацилл из концентратов: А – штамм *B. toyonensis* В-13249; Б – штамм *B. pumilus* В-13250

В виду того, что готовый бактериальный препарат явился поликомпонентным, в нем наблюдали два морфологически различных вида бацилл. На рисунке 16 приведен внешний вид КОЕ микробов в готовом препарате.



Рисунок 16 – Внешний вид колоний бацилл в готовом препарате: 1 – колония *B. toyonensis* В-13249, 2 – колония *B. pumilus* В-13250

В процессе разработки оптимального технологического режима опытно-промышленного производства отработали технологию культивирования *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, при которой численность живых споровых бактерий была не менее 1×10^{11} КОЕ/г в высушенных концентратах. В связи с этим, готовый препарат целесообразно производить при титре живых споровых бактерий не менее 1×10^{10} КОЕ/г, так как сохранение бактерий в степени 11 в готовом препарате увеличивало количество ферментаций и, соответственно, конечный продукт был бы существенно дороже. Более оптимальным для сохранения количества клеток, эффективности препарата, снижения себестоимости и возможности стандартизации определили контрольные значения титра готового препарата 1×10^{10} КОЕ/г.

После нескольких циклов смешивания с наполнителем добились стандартизированного готового препарата с численностью – $1,34(\pm 0,30) \times 10^{10}$ КОЕ/г, из которых *B. pumilus* В-13250 принадлежала доля в $1,28(\pm 0,11) \times 10^{10}$ КОЕ/г, а *B. toyonensis* В-13249 – $1,07(\pm 0,08) \times 10^{10}$ КОЕ/г. Санитарно-показательные микроорганизмы из группы кишечной палочки ни в концентратах, ни в готовом бактериальном препарате не обнаружили.

3.3.2 Установление сроков годности готового препарата

Для установления срока годности готового микробного препарата на протяжении 12 месяцев образцы опытной партии препарата хранили при двух температурах: 5 °С и 20 °С. Каждый месяц образцы проверяли на численность бацилл и наличие/отсутствие посторонних микроорганизмов. Результаты исследования представлены на рисунке 17.

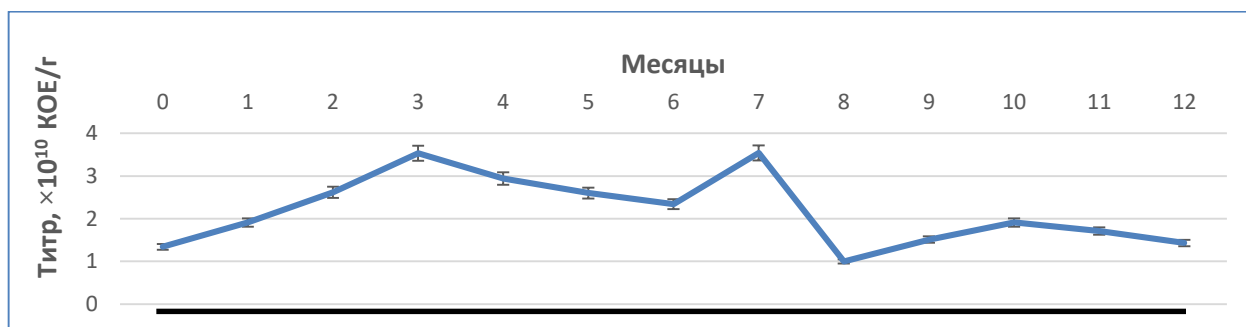


Рисунок 17 – Изменение численности бацилл в готовом препарате в ходе хранения

В ходе хранения препарата в течение 12 месяцев титр менее 1×10^{10} КОЕ/г не зафиксировали, БГКП не обнаружили, поэтому стало возможным рекомендовать срок хранения препарата – не менее 12 месяцев. Однако, первая контрольная партия полученного пробиотического препарата уже на протяжении более 36 месяцев сохраняет исходные показатели по численности и чистоте.

Отдельно стоит отметить, что на протяжении времени хранения оба штамма сохранили свою жизнеспособность, т.е. препарат остался поликомпонентным. Также в ходе хранения в течение 12 месяцев сохранились цвет и консистенция препарата. Посторонние запахи также не выявили.

3.4 Испытания токсичности готового пробиотического препарата на лабораторных мышах

3.4.1 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 дышали более глубоко, прерывисто, частота дыхательных движений у них составляла в среднем 120 раз в минуту. Мыши начинали перемещаться по клетке, чистить мордочку, затем снова сидели без движения. Полное восстановление двигательной активности лабораторных животных происходило в течение 40–60 минут после введения препарата. В контрольной группе признаков интоксикации не отмечали.

При дальнейшем наблюдении, никаких видимых отличий по количеству потребляемого корма и воды в опытных группах по сравнению с мышами, которым, внутрижелудочно, вводили воду, не отмечали. На протяжении всего эксперимента, динамика роста массы тела лабораторных животных, была положительной. Процент прироста живой массы в опытных группах самцов, получавших пробиотический препарат, был меньше в среднем на 17%, в опытных группах самок – на 21%, в сравнении с контрольной группой (таблица 18).

Таблица 18 – 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 ($\pm 0,95$)	23,71 ($\pm 0,83$)	27,61 ($\pm 0,60$)	+ 43,8
Опытная группа (0,5 мл р-ра препарата)	19,85 ($\pm 0,02$)	23,18 ($\pm 0,72$)	26,64 ($\pm 0,81$)	+ 34,3
Самки				
Контрольная (0,5 мл вода)	19,52 ($\pm 0,85$)	22,32 ($\pm 0,50$)	25,22 ($\pm 0,38$)	+ 29,2
Опытная группа (0,5 мл р-ра препарата)	18,94 ($\pm 0,43$)	21,65 ($\pm 0,34$)	23,84 ($\pm 0,43$)	+ 25,9

При оценке состояния внутренних органов на основе определения массового коэффициента выявили достоверное различие по величине почек у мышей-самцов, которым вводили препарат на 28,4%, соотношение массы данного органа к массе тела оказалось меньше, чем в контроле (таблица 19). В опытной группе самок, где вводили препарат, массовый коэффициент почек также достоверно был меньше на 12%. Массовые коэффициенты для печени, сердца и селезенки в опытных группах также оказались незначительно меньше, чем у контрольных животных, однако разница не была достоверна. Таким образом, препарат оказал эндокринно-связанный эффект в первую очередь на почки лабораторных животных.

Таблица 19 – Массовые коэффициенты внутренних органов мышей

Группа животных	Внутренние органы мышей			
	Печень	Почки	Селезенка	Сердце
Самцы				
Контрольная (0,5 мл вода питьевая)	6,63 ($\pm 0,56$)	1,86 ($\pm 0,13$)	0,45 ($\pm 0,06$)	0,55 ($\pm 0,04$)
Опытная группа (0,5 мл р-ра препарата)	6,69 ($\pm 0,24$)	1,45 ($\pm 0,04$)*	0,42 ($\pm 0,02$)	0,46 ($\pm 0,02$)
Самки				
Контрольная (0,5 мл вода питьевая)	6,85 ($\pm 0,23$)	1,17 ($\pm 0,01$)	0,58 ($\pm 0,10$)	0,50($\pm 0,03$)
Опытная группа (0,5 мл р-ра препарата)	5,63 ($\pm 0,40$)	1,04 $\pm 0,03$ *	0,47 ($\pm 0,04$)	0,48($\pm 0,03$)

Результаты исследований показали, что однократное внутрижелудочное введение биопрепарата белым мышам в дозе 12500 мг/кг не вызвало их гибели, но привело к интоксикации и дальнейшему снижению динамики прироста живой массы животных в среднем на 17 и 21%, в опытных группах самцов и самок, соответственно, в сравнении с контрольной группой. При расчете массовых

коэффициентов органов отмечалось достоверное уменьшение почек у мышей опытных групп в среднем в 1,2–1,5 раза.

На основании проведенных исследований можно заключить, что доза 12500 мг/кг является безопасной для применения, а препарат, согласно общепринятой классификации [298] относится к веществам малоопасным (4 класс) [251].

3.4.2 Хроническая токсичность

При наблюдении за мышами никаких видимых отличий по количеству потребляемого корма и воды в опытной группе по сравнению с контрольной, не отметили. На протяжении всего эксперимента, динамика роста массы тела 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 20).

Таблица 20 – Динамика набора массы тела мышей

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

Таблица 21 – 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-ра 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.

На основании проведенных исследований можно заключить, что исследуемая суточная доза пробиотического препарата 4 г/кг является безопасной для применения, а сам препарат, согласно общепринятой классификации [298], следует отнести к веществам малоопасным (4 класс опасности) [251].

3.5 Промышленные испытания пробиотического препарата на объектах аквакультуры

Целью наших промышленных испытаний являлось изучение эффективности нового разработанного пробиотического препарата на инкубацию цист *A. franciscana* на базе ООО «Арсал», одного из крупнейших экспортеров артемии в России (приложение 1). А также, эффект пробиотического препарата на скорость прохождения личиночной стадии у *M. rosenbergii* и дополнительно исследовать общие химические показатели воды в УЗВ, определить дозировку пробиотического препарата для всех указанных вариантов применения.

3.5.1 Испытание препарата на рачках артемии

Известно, что науплиусы артемии массово начинают вылупляться из цист после 20 часов инкубации и через 6–8 часов после рождения начинают активно питаться. Таким образом, в течение 48 часов инкубации цисты артемии не только осеменяют поверхность науплиусов, но и заселяют их желудочно-кишечный тракт пробиотическими бациллами. Исследование показало, что в обеих партиях цист артемии добавление препарата дало положительный эффект, что выразилось в увеличении биомассы по сравнению с контролем. Кроме того, консорциум

штаммов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 в процессе своей жизнедеятельности благоприятно изменил условия среды обитания артемий. Это проявлялось в увеличении процента вылупления цист *A. franciscana* в опыте, по сравнению с контролем, что также может быть связано с антагонистическими свойствами используемых бацилл по отношению к возбудителям. Результаты исследования по партии цист Z29.04 представлены в таблице 22, а по партии цист С9 – в таблице 23. При этом, с обеими партиями лучшие результаты по выходу биомассы получены при добавлении 0,1 г препарата на 2 г сухих цист.

Таблица 22 – Результаты 48 часов инкубирования цист 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 столь значительно, но в лучшую сторону (на 1,4% максимально). При добавлении препарата к партии С9 отмечался прирост HR примерно на 10%. Коэффициент вариации от 3 до 5% говорил о незначительном разбросе значений, и позволило предполагать о достоверности полученного результата.

Таблица 23 – Результаты 48-часовой инкубирования 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

При добавлении препарата к партии С9 отмечали увеличение HR примерно на 10%. Коэффициент вариации при работе со второй опытной партией был значительно выше (6,4–11,8%). При этом наименьшая вариация отмечена в опытной группе при добавлении 0,1 г препарата.

Выход биомассы показал, какая масса рачков артемии получилась после инкубации. На графике показаны результаты корреляции между применяемой

дозой пробиотического препарата и выходом биомассы *A. franciscana* из двух независимых партий, взятых из двух разных озер (рисунок 18).

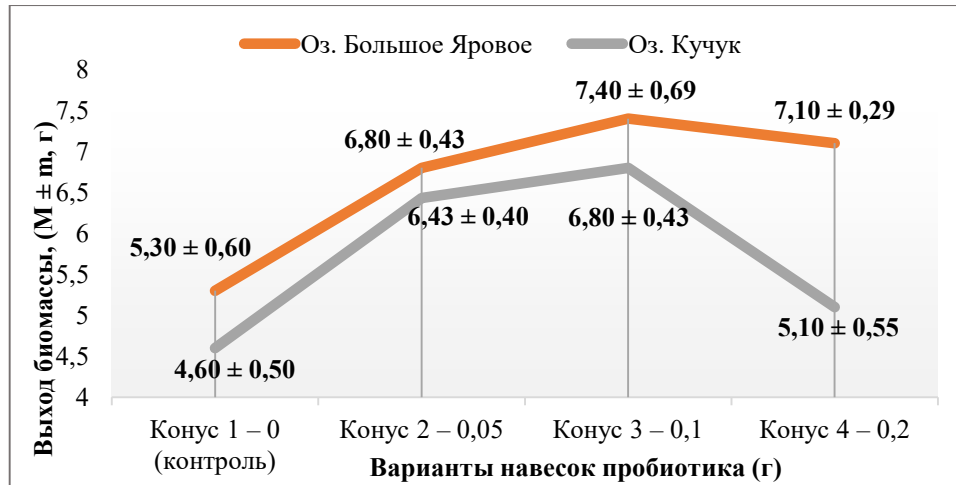


Рисунок 18 – Корреляция между концентрацией препарата и выходом биомассы

Как видно на изображении, максимальный выход биомассы зафиксировали при навеске пробиотика 0,1 г/2 г цист в обеих экспериментальных партиях цист, что соответствует данным, описанным в таблице 22 и 23.

Разные образцы цист *A. franciscana* (С9 и Z29.04) имели разный процент вылупления и выхода биомассы в контрольных конусах. Однако, в обеих партиях наблюдали снижение этих показателей при добавлении 0,2 г пробиотического препарата по сравнению с лучшим результатом в конусе 3 (0,1 г). Пробиотический эффект наиболее выражен при изначально низких показателях процента выклева и выхода биомассы, как в случае с партией С9. В первой опытной группе Z29.04 (пробы цист из оз. Большое Яровое) наблюдался заметно более высокий процент вылупления, что являлось нормой для данной партии артемии и не связано с применением препарата. Минимальный разброс показателей партии Кучук (С9) наблюдали именно в опытной группе при добавлении 0,1 г пробиотического препарата. Это может косвенно свидетельствовать о стабилизирующем влиянии пробиотического препарата на вылупление. Различия в проценте вылупления в разных образцах цист артемии (Z29.04 и С9) связаны с тем, что они были получены из разных соленых озер. Следовательно, они могли характеризоваться различными свойствами, поскольку эволюционировали в разных экосистемах.

Таким образом, новый пробиотический препарат на основе штаммов *B. toyonensis* B-13249 и *B. pumilus* B-13250 оказал положительный эффект на процент выклева цист и выход биомассы *A. franciscana*. Рекомендуемая доза – 0,1 г препарата на 2 г цист. Увеличение процента выклева при добавлении препарата в данной концентрации к партии Z29.04 составило 1,4%, а при добавлении биопрепарата к партии С9 – 10%. Выход биомассы в контрольных конусах для партий Z29.04 и С9 составил 5,30 ($\pm 0,60$) г и 4,60 ($\pm 0,50$) г, соответственно. При добавлении пробиотического препарата к данным партиям в концентрации 0,1 г выход биомассы составил 7,40 ($\pm 0,69$) г и 6,80 ($\pm 0,43$) г соответственно [221].

3.5.2 Испытания на креветках Розенберга

В ходе кормления на ранних стадиях развития креветки требовательны к подвижности корма. В связи с этим, в аквакультуре повсеместно применяется технология кормления предличинок креветок живыми, только что выклюнувшимися науплиусами артемии [299]. Инкубационный раствор для *A. franciscana* является весьма благоприятной средой для развития любой, в том числе неблагоприятной микрофлоры, влияющей на качество конечного продукта. По этой причине, производители артемии заинтересованы в добавлении пробиотических и пребиотических препаратов в свой продукт для снижения возможного развития патогенов и перенесения их к предличинкам креветок [300]. Вылупившаяся личинка креветки Розенберга проходит 11 различных личиночных стадий, чтобы стать постличинкой. По литературным данным этот процесс занимает приблизительно 22–45 дней [301, 302].

Согласно полученным данным, в опытной группе наблюдали более ранний выход *M. rosenbergii* из личиночной стадии – на 18 день. В контрольной группе – на 28 день (рисунок 19). Выживаемость в обеих группах существенно не различалась и была более 90%.

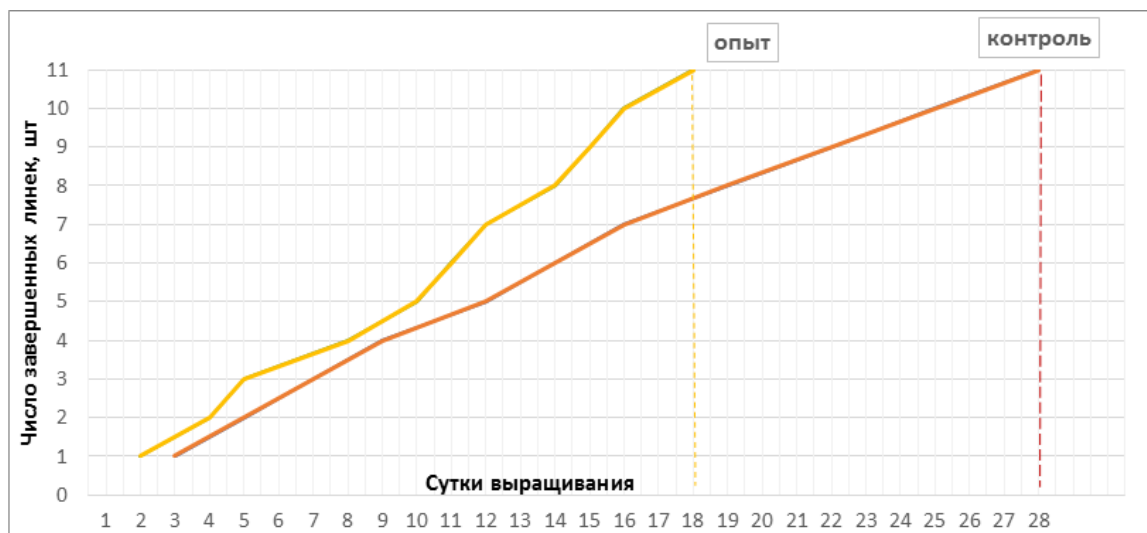


Рисунок 19 – Сроки завершения метаморфоза личинок *M. rosenbergii* в опытной и контрольной группах

Согласно полученным данным, в опытной группе креветок процесс линек завершился за 18 дней, что на 10 дней быстрее, чем в контроле. Данный результат свидетельствует о положительном эффекте пробиотического препарата на скорость прохождения личиночной стадии у *M. rosenbergii*. Это может быть обусловлено антагонистическими свойствами бацилл препарата по отношению к патогенам креветок, повышением эффективности усвоения пищи личинками за счет синтеза микробами различных пищеварительных ферментов и др. Для подтверждения этих гипотез необходимы дополнительные исследования [194].

3.5.3 Влияние пробиотического препарата на гидрохимию воды в установках замкнутого водоснабжения

В то же время, личинки ракообразных требовательны к качеству воды, и его классически контролируют по аммонии, нитритам и нитратам. Так как азотсодержащие соединения в больших концентрациях пагубно влияют на развитие креветок [303].

В соответствии с полученными данными, отображаемыми на рисунке 20, добавление пробиотического препарата в среду для культивирования креветок, положительно сказалось и на гидрохимических показателях воды.

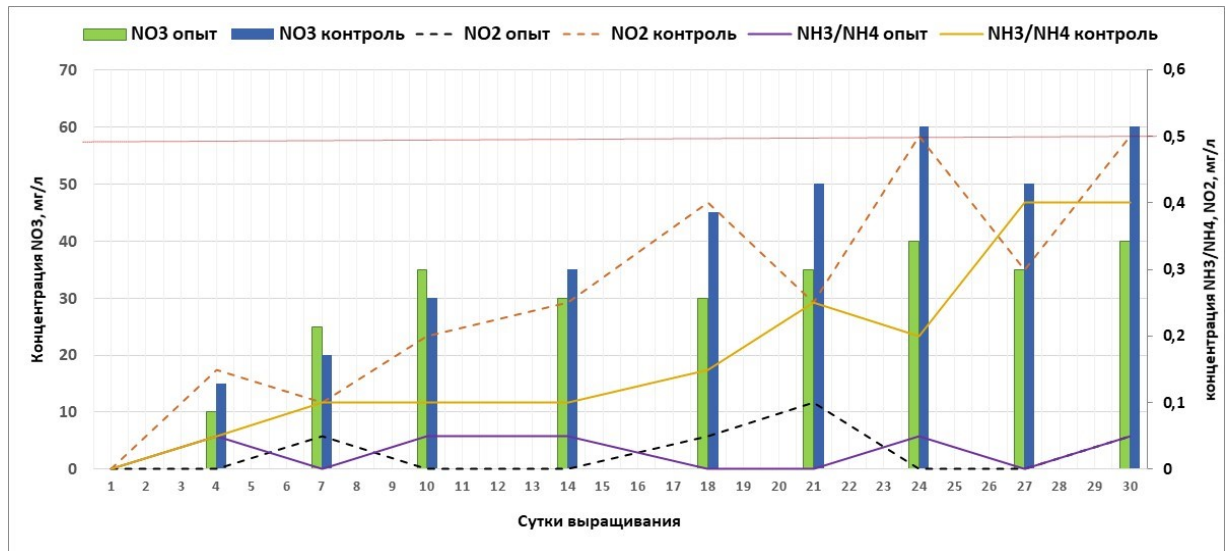


Рисунок 20 – Гидрохимический режим в опытной и контрольной системах

Концентрация аммонийного (NH_4) и нитритного (NO_2) азота в контрольной системе к окончанию эксперимента достигла верхнего предела нормы (0,5 мг/л), а в опыте – 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 установлена первичная дозировка для установок замкнутого водоснабжения – 5 г на 600 литров оборотной воды раз в неделю [194].

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 оксациллину;

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; pH – 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 бацилл 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 процент выклева 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. A Review on Shrimp Aquaculture in India: Historical Perspective, Constraints, Status and Future Implications for Impacts on Aquatic Ecosystem and Biodiversity / M. Salunke, A. Kalyankar, C.D. Khedkar [et al.] // Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. – 2020. – V. 28. – №. 3. – P. 283-302.
2. Aquaculture Production and Its Environmental Sustainability in Thailand: Challenges and Potential Solutions / T. Sampantamit, L. Ho, C. Lachat [et al.] // Sustainability. – 2020. – V. 12. – №. 5. – P. 2010.
3. Eco-efficiency assessment of shrimp aquaculture production in Mexico / A. Cortes, R. Casillas-Hernandez, C. Cambeses-Franco [et al.] // Aquaculture. – 2021. – V. 544. – №. 737145. – P. 1-10.
4. Effects of *Bacillus aryabhattai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* / S. Tapaamorndech, K. Chantarasakha, Y. Kingcha [et al.] // Fish and Shellfish Immunology. – 2019. – V. 86. – P. 4-13.
5. Stappen V.G. Biology and ecology of *Artemia*. In: P Lavens, P Sorgeloos (eds) / V.G. Stappen // Manual on Production and Use of Live Food for aquaculture. Fisheries Technical Paper FAO, Rome. – 1996. – №. 361. – P. 79-106.
6. *Vibrio* spp. Control at Brine Shrimp, *Artemia*, Hatching and Enrichment / J. Interaminense, N.F. Calazans, C.V. Bruna [et al.] // Journal of the World Aquaculture society. – 2014. – V. 45. – №. 1. – P. 65-74.
7. Incidence of *E. coli* in extensive shrimp culture systems of Kerala / S. Lekshmy, W. Soumya, M.A. Nansi [et al.] // Indian Journal of Scientific Research. – 2014. – V. 9. – №. 1. – P. 117-126.
8. Faridullah M. Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in shrimp (*Penaeus monodon*) farms, depots and processing plants in different areas of Bangladesh / M. Faridullah, V.C. Roy, U.J. Lithi // Asian Journal of Medical and Biological Research. – 2016. – V. 2. – №. 2. – P. 171-176.

9. Антибиотики в объектах аквакультуры и их экологическая значимость. Обзор / Л.В. Шульгина, Е.В. Якуш, Ю.П. Шульгин [и др.] // Известия ТИНРО. – 2015. – Т. 181. – С. 216-230.
10. Evaluation of the Impacts of Long-Term Enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on Growth Performance, Reproduction, Intestinal Microflora, and Resistance to *Aeromonas hydrophila* of Ornamental Fish *Poecilia latipinna* / N. Ahmadifard, V.R. Aminloo, A. Tukmechi [et al.] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2019. – V. 11. – P. 957-965.
11. Probiotics: Comprehensive Exploration of the Growth Promotion Mechanisms in Shrimps / Jo.X.H. Goh, L.T.-H. Tan, J.W.-F. Law [et al.] // Progress in Microbes and Molecular Biology. – 2023. – V. 6. – №. 1. a0000324.
12. Molnar K. Field guide to the control of warmwater fish diseases in Central and Eastern Europe, the Caucasus and Central Asia. FAO Fisheries and Aquaculture Circular Ankara / K. Molnar, C. Szekely, M. Lang // FAO. – 2020. – V. 1182.
13. FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
14. Levy S.B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses / S.B. Levy, B. Marshall // Nature Medicine. – 2004. – V. 10. – №. 12. – P. 122-129.
15. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia / O.L. Akinbowale, H. Peng, P. Grant [et al.] // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2007. – V. 30. – №. 2. – P. 177-182.
16. Baquero F. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments / F. Baquero, J.-L. Martínez, R. Cantón // Current Opinion in Biotechnology. – 2008. – V. 19. – №. 3. – P. 260-265.
17. Penders J. Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of The Netherlands / J. Penders, E.E. Stobberingh // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2008. – V. 31. – №. 3. – P. 261-265.

18. Smith P. Antimicrobial resistance in aquaculture / P. Smith // *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics). – 2008. – V. 27. – №. 1. – P. 243-264
19. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment / A.H. Buschmann, A. Tomova, A. López [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – №. 8. e42724.
20. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health / F.C. Cabello, H.P. Godfrey, A. Tomova [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 15. – №. 7. – P. 1917-1942.
21. Marti E. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance / E. Marti, E. Variatza, J.L. Balcazar // *Trends in Microbiology*. – 2014. – V. 22. – №. 1. – P. 36-41.
22. O'Neill J. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste / J. O'Neill // *The review on antimicrobial resistance*. – 2015. – P. 1-44.
23. Economou V. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria / V. Economou, P. Gousia // *Infection and Drug Resistance*. – 2015. – V. 8. – №. 1. – P. 49-61.
24. Antibiotic Application and Emergence of Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in Global Catfish Aquaculture / L.-O. Chuah, M.E. Effarizah, A.M. Gon [et al.] // *Current Environmental Health Reports*. – 2016. – V. 3. – P. 118-127.
25. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions / J.E.M. Watts, H.J. Schreier, L. Lanska [et al.] // *Marine drugs*. – 2017. – V. 15. – №. 158. – P. 1-16.
26. Antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. strains isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture farms / C. Scarano, F. Piras, S. Viridis [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2018. – V. 284. – P. 91-97.
27. Antimicrobial Susceptibility Profiles and Resistance Genes in Genus *Aeromonas* spp. Isolated from the Environment and Rainbow Trout of Two Fish Farms

in France / N. Hayatgheib, S. Calvez, C. Fournel [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – №. 6. – P. 1201.

28. Ferri G. Antibiotic Resistance in the Finfish Aquaculture Industry: A Review / G. Ferri, C. Lauteri, A. Vergara // *Antibiotics*. – 2022. – V. 11. – №. 11. – P. 1574.

29. Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives / S.H. Hoseinifar, Yu.-Zh. Sun, A. Wang [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 2429.

30. Wall S. Prevention of antibiotic resistance – an epidemiological scoping review to identify research categories and knowledge gaps / S. Wall // *Global health action*. – 2019. – V. 12. – P. 1756191.

31. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects / T.M. Uddin, A.J. Chakraborty, A. Khusro [et al.] // *Journal of Infection and Public Health*. – 2021. – V. 14. – P. 1750-1766.

32. Larsson D.G.J. Antibiotic resistance in the environment / D.G.J. Larsson, C.-F. Flach // *Nature reviews. Microbiology*. – 2022. – V. 20. – P. 257-269.

33. Гусева Е.А. Формирование научных основ использования панкреатического гидролизата соевого белка в питании рыб в промышленных условиях: автореф ... доктора сельскохозяйственных наук: 06.02.08 / Гусева Юлия Анатольевна – Саратов, 2019. – 39 с.

34. Recommendations and Action Plans to Improve Ex Situ Nutrition and Health of Marine Teleosts / S. Williams, M. Stoskopf, R. Francis-Floyd [et al.] // *Journal of Aquatic Animal Health*. – 2022. – V. 34. – P. 69-81.

35. Long-term incorporation of Selenium and Zinc in microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* and its effects on rotifer / N. Ahmadifard, S. Ghaderpour, N. Agh [et al.] // *Aquaculture Research*. – 2022. – T. 53. – №. 8. – C. 3188-3201.

36. Complete replacement of fish oil by three microalgal products rich in n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in early weaning microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) / M. Carvalho, B. Marotta, H. Xu [et al.] // *Aquaculture*. – 2022. – V. 558. – P. 738354.

37. Effects of dietary docosahexaenoic acid enrichment in *Artemia* feed on the growth, survival, and fatty acid composition of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) larvae / J. Choi, G.S. Han, S.-G. Byun [et al.] // Aquaculture research. – 2022. – V. 53. – №. 12. – P. 4353-4362.

38. Evaluation of the nutritional value of *Artemia nauplii* for European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae / A.A. El-Dahhar, R.S. Rashwan, S.Y. EL-Zaeem [et al.] // Aquaculture and Fisheries. – 2022. – P. 1-7.

39. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing / K. Hamre, M. Yufera, I. Rønnestad [et al.] // Reviews in Aquaculture. – 2013. – V. 5. – №. 1. – P. 26-58.

40. Optimization of the Balance between Protein, Lipid and Carbohydrate in Diets for Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) / K. Hamre, G.M. Berge, Ø. Saele [et al.] // Aquaculture Nutrition. – 2022. – V. 2022. – P 1-15.

41. Jang B.I. Evaluation of the Optimal Protein Required in Granulated Microdiets for Rockfish (*Sebastes schlegeli*) Larvae / B.I. Jang, O.S. Olowe, S.H. Cho // Aquaculture Nutrition. – 2022. – V. 9.

42. Lall S.P. 3 - Nutritional requirements of cultured fish: formulating nutritionally adequate feeds / S.P. Lall, A. Dumas // Feed and Feeding Practices in Aquaculture (Second Edition). – 2022. – P. 65-132.

43. Effect of HUFA- and vitamin C-enriched live food, infusoria on growth and survival of *Clarias Magur* (Hamilton, 1822) larvae / Jh. Lal, P. Kumar, S. Rai [et al.] // Aquaculture research. – 2022. – V. 53. – №. 17. – P. 5865-5874.

44. Effects of Chitosan-Coated Microdiet on Dietary Physical Properties, Growth Performance, Digestive Enzyme Activities, Antioxidant Capacity, and Inflammation Response of Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) Larvae / Ji. Liu, W. Xu, Yo. Liu [et al.] // Aquaculture Nutrition. – 2022. – V. 2022. e4355182. – P. 1-11.

45. Mai K. Chapter 3 – Vitamins. Fish Nutrition (Fourth Edition) / K. Mai, R. Waagbø, X.Q. Zhou, Q.H. Ai, L. Feng. – London: Academic Press. – 2022. – P. 57-179.

46. Effects of formulated microdiets on weaning success and larval performance of pike silverside *Chirostoma estor* (Jordan, 1879) / E. Martínez-Angeles, E. Castillo-

Quintana, P. Navarrete-Ramírez [et al.] // *Animal Feed Science and Technology*. – 2022. – V. 288. e115288.

47. Effects of enrichment *Artemia* with organic selenium and essential fatty acids on growth performance and fatty acid composition of barramundi (*Lates calcarifer*) larvae / H.D. Pham, M.-H. Le, K.V. Dinh [et al.] // *Regional Studies in Marine Science*. – 2022. – V. 55. e102595.

48. Replacing fish oil with crude palm oil in the diet of larval hybrid lemon fin barb (*Barbonymus gonionotus* ♀, *Hypsibarbus wetmorei* ♂) / R. Weerasingha, M.S. Kamarudin, M.M.A. Karim [et al.] // *Aquaculture Reports*. – 2022. – V. 24. – P. 101121.

49. Litvinenko L.I. Brine shrimp *Artemia* in Western Siberia lakes / L.I. Litvinenko, A.I. Litvinenko, E.G. Boyko; Translation from Russian A. Otarova, M. Korentovich, L. Litvinenko. – Novosibirsk: Nauka, 2016. 295 p.

50. Современное состояние и перспективы развития аквакультуры артемии в России / Н.П. Ковачева, Л.И. Литвиненко, Е.М. Саенко [и др.] // *Труды ВНИРО*. – 2019. – Т. 178. С. 150-171.

51. The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* / S. Ziaei-nejad, M. Habibi-Rezaei, Gh.A. Takami [et al.] // *Aquaculture*. – 2006. – V. 252. – №. 2-4. – P. 516-524.

52. Богатыренко Е.А. Пробиотики и их применение в марикультуре / Е.А. Богатыренко // *Известия ТИНРО*. – 2009. – №. 157. – С. 189-196.

53. Screening and selection of bacteria inhibiting white spot syndrome virus infection to *Litopenaeus vannamei* / A. Sekar, My. Kim, H. Jeon [et al.] // *Biochemistry and Biophysics Reports*. – 2019. – V. 19. e100663.

54. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* / K. Amoah, Q.-Ch. Huang, B.-P. Tan [et al.] // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2019. – V. 87. – P. 796-808.

55. Dynamics and succession of plankton communities with changing nutrient levels in tropical culture ponds of whiteleg shrimp / V. Fernandes, E.A. Sabu, M.S. Shivaramu [et al.] // *Aquaculture environment interactions*. – 2019. – V. 11. – P. 639-655.

56. Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains / Yu-Ch. Wang, Sh.-Ya. Hu, Ch.-Sh. Chiu [et al.] // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2019. – V. 84. – P. 1050-1058.

57. Enrichment of *Artemia* nauplii with *Lactobacillus sporogenes* for Enhancing the Survival, Growth and Levels of Biochemical Constituents in the PostLarvae of the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* / C. Seenivasan, P.S. Bhavan, S. Radhakrishnan [et al.] // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 2012. – V. 12. – №. 1. – P. 23-31.

58. Ofelio C. Administration of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 as a strategy for the control of *Vibrio* bacteria in the brine shrimp *Artemia* / C. Ofelio, M. Planas, J. Pintado // *Letters in Applied Microbiology*. – 2021. – V. 73. – №. 3. – P. 336-342.

59. Patra S.K. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio* / S.K. Patra, K.S. Mohamed // *Aquaculture International*. – 2003. – V. 11. – №. 5. – P. 505-514.

60. Standartization of the bioencapsulation of probiotics and oil emulsion in *Artemia parthenogenetica* / A. Isamma, K.R. Divya, V. Ramasubramanian [et al.] // *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*. – 2014. – V. 4. – №. 3. – P. 122-125.

61. Use of probiotics in aquaculture / P.M. Cruz, A.L. Ibáñez, O.M. Hermosillo [et al.] // *International Scholarly Research Network ISRN Microbiology*. – 2012. – V. e916845.

62. Srisapoome P. Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus): Laboratory and on-farm trials / P. Srisapoome, N. Areechon // Fish & Shellfish Immunology. – 2017. – V. 67. – P. 199-210.

63. Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance / X.-Ya. Gao, Yi. Liu, Li-Li Miao [et al.] // AMB Express. – 2017. – V. 7. – P. 1-10.

64. Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes / D.T. Truong, A. Tett, E. Pasolli [et al.] // Genome Research. – 2017. – V. 27. – P. 626-638.

65. Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* species on fish / F. Feliatra, Z.A. Muchlisin, H.Yu. Teruna [et al.] // F1000Research. – 2018. – V. 7. – №. 415.

66. Пат. 2694522 Российская Федерация, МПК⁵¹ С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis* / Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2018146694; заявл. 25.12.18; опубл. 16.07.19, Бюл. № 20. – 11 с.

67. Пат. 2693439 Российская Федерация, МПК⁵¹ С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* / Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2018146696; заявл. 25.12.18; опубл. 02.07.19, Бюл. № 19. – 10 с.

68. Ризосферные бактерии / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева [и др.] // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – №. 2. – С. 207–224.

69. Development of a microbiological preparation for crops based on *Bacillus pumilus* strains / A. Malkova, I. Evdokimov, M. Shirmanov [et al.] // BIO Web of Conferences. – 2021. – №. 36. – e07012.

70. Садунова А.В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus* / А.В. Садунова. – Владивосток: Дальневосточный федеральный университет. – 2014. – 66 с.

71. Vos P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. – New York: Springer-Verlag. – 2009. – V. 3. – 1450 p.

72. Эндوفитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – №. 5. – С. 648-654.

73. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – Т. 24. – №. 4. – С. 36-43.

74. Евдокимова О.В. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦР / О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Молекулярная и прикладная генетика. – 2016. – Т. 21. – С. 53-62.

75. Глинская Е.В. Гетерогенность свойств бактерий рода *Bacillus*, выделенных из колбасных изделий / Е.В. Глинская, Н.Ф. Пермьякова // Успехи современного естествознания. – 2004. – №. 2. – С. 123-125.

76. Феоктистова Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВППП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – Т. 29. – №. 1. – С. 69-76.

77. Изучение антагонистической активности микроорганизмов рода *Bacillus* / О.О. Бабич, А.Ю. Просеков, С.А. Сухих [и др.] // Векторы развития современной науки. – 2015. – Т. 1. – С. 3-6.

78. Пат. 2405821 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, А 61 К 35/74, С 12 R 1/70. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* "Пашков" – продуцент биологически активных веществ, обладающих антагонистической активностью в отношении условнопатогенных, патогенных бактерий, дрожжевых грибов и вирусов / Гринько О.М., Михайлова Н.А., Пашков Е.П., Буданова Е.В.; заявитель и патентообладатель НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава – № 2009129639; завял. 04.08.2009; опубл. 10.12.2010, Бюл. № 34. – 7 с.

79. Изыскание антибиотиков, эффективных в отношении бактерий с лекарственной устойчивостью, на примере *Bacillus pumilus* продуцента антибиотика амикумацина А / Т.А. Ефименко, И.А. Маланичева, В.А. Зенкова [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – Т. 174. – №. 13. – С. 27-31.

80. Антимикробные свойства амикумацина А / О.В. Ефременкова, Н.И. Габриэлян, И.А. Маланичева [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62. – №. 1-2. – С. 16-19.

81. Aunpad R. Pumilicin 4, A Novel Bacteriocin with Anti-MRSA and Anti-VRE Activity Produced by Newly Isolated Bacteria *Bacillus pumilus* Strain WAPB4 / R. Aunpad, K. Na-Bangchang // Current Microbiology. – 2007. – V. 55. – №. 4. – P. 308-313.

82. From C. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice / C. From, V. Hormazabal, P.E. Granum // International Journal of Food Microbiology. – 2007. – V. 115. – №. 3. – P. 319-324.

83. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* Ч–13 – продуцента биопрепаратов / В.К. Чеботарь, Н.М. Макарова, А.И. Шапошников [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – №. 4. – С. 465-469.

84. Morikawa M. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, Psf-1 / M. Morikawa // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1992. – V. 74. – №. 5. – P. 255-261.

85. Гринько О.М. Экспериментальное изучение антагонистических свойств штамма бактерий *Bacillus pumilus* «Пашков»: автореф ... кандидата биологических наук: 03.02.02 / Гринько Ольга Михайловна. – Москва, 2010. – 24 с.
86. Скрининг штаммов бактерий рода *Bacillus* – активных антагонистов фитопатогенов бактериальной и грибной природы / А.Ю. Грабова, И.В. Драгозов, Л.А. Крючкова [и др.] // Мікробіол. журн. – 2015. – Т. 77. – №. 6. – С. 47-54.
87. Effects of Different Cultivation Parameters on the Production of Surfactin Variants by a *Bacillus subtilis* Strain / A. Barta, A. Vigneshwari, B. Bóka [et al.] // Molecules. – 2018. – V. 23. – №. 10. – P. 2675.
88. Munimbazi C. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus* / C. Munimbazi, L.B. Bullerman // Journal of Applied Microbiology. – 1998. – V. 84. – №. 6. – P. 959-968.
89. Характеристика изменений парамагнитных центров микробной клетки под действием рибонуклеазы *Bacillus pumilus* / П.В. Зеленихин, А.В. Макеева, А.П. Ложкин [и др.] // Микробиология. – 2014. – Т. 83. – №. 1. – С. 56-62.
90. Характеристика физико-химических свойств и показателей химической микробиологической безопасности ферментативных гидролизатов отходов потрошения птицы / Л.К. Асякина, В.Ф. Долганюк, И.С. Милентьева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2017. – №. 3. – С. 5-14.
91. Галицкая П.Ю. Определение метрологических характеристик микробного теста на основе ингибирования дегидрогеназной активности *Bacillus pumilus* / П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская // Ученые записки Казанского университета. – 2006. – Т. 148. – №. 2. – С. 63-72.
92. Черёмин А.М. Механизмы регуляции экспрессии генов сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* 7P: автореф. ... кандидата биологических наук: 03.02.03 / Черемин Андрей Михайлович. – Казань, 2014. – 26 с.
93. Каюмов А.Р. Механизмы регуляции бактериальных субтилаз / А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. – 2005. – Т. 147. – №. 2. – С. 89-98.

94. Сравнительная характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста / Ю.В. Данилова, Н.П. Балабан, Т.Р. Шамсутдинов [и др.] // Ученые записки Казанского университета. – 2012. – Т. 154. – №. 2. – С. 55-65.

95. Действие метцинкиновой металлопротеиназы бацилл на перевиваемые культуры клеток животных / Ю.В. Данилова, Ю.М. Кириллова, Н.Л. Рудакова [и др.] // Гены и клетки. – 2014. – Т. 1. – №. 9. – С. 72-76.

96. Кипрушкина Е.И. Экологически безопасные методы в интегрированной защите и сохранении растительной продукции / Е.И. Кипрушкина, В.С. Колодязная, В.К. Чеботарь // Пищевая промышленность. – 2013. – Т. 2. – С. 8-10.

97. Пат. 2511416 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/21. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* 2a-5 с низкой протеолитической активностью, повышенной активностью фосфатазы, способ его получения и применения / Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Мухаметзянова А.Д., Шагимарданова Е.И., Тойменцева А.А., Чулунцэцэг Н., Марданова А.М., Ахметова А.И.; заявитель и патентообладатель ФГАО ВПО КФУ – № 2012145331; заявл. 24.10.2012; опубл. 10.04.2014, Бюл. № 10. – 9 с.

98. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева [и др.] // Ученые Записки Казанского Университета. – 2017. – Т. 159. – С. 85-107.

99. Li L. *Bacillus pumilus* strain LYMC-3 shows nematocidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* via the production of a guanidine compound / L. Li, J. Tan, F. Chen // Biocontrol Science and Technology. – 2018. – V. 28. – №. 12. – P. 1128-1139.

100. Systems-wide temporal proteomic profiling in glucose-starved *Bacillus subtilis* / A. Otto, J. Bernhardt, H. Meyer [et al.] // Nature Communications. – 2010. – V. 1. – №. 1.

101. *Bacillus pumilus* Reveals a Remarkably High Resistance to Hydrogen Peroxide Provoked Oxidative Stress / S. Handtke, R. Schroeter, B. Jürgen [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – №. 1. e85625.

102. Extracellular Proteome Profiling of *Bacillus pumilus* SCU11 Producing Alkaline Protease for Dehairing / C. Wang, S. Yu, T. Song [et al.] // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 26. – №. 11. – P. 1993-2005.
103. Global quantification of phosphoproteins combining metabolic labeling and gel-based proteomics in *B. pumilus* / C. Hentschker, C. Dewald, A. Otto [et al.] // Electrophoresis. – 2017. – V. 39. – №. 2. – P. 334-343.
104. Brack Ch. 2,5-Diketopiperazines produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus* / Ch. Brack, A. Mikolasch, F. Schauer // Marine Biotechnology. – 2014. – V. 16. – №. 4. – P. 385-395.
105. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus* / Ch. Brack, A. Mikolasch, R. Schlueter [et al.] // Marine Biotechnology. – 2015. – V. 17. – №. 3. – P. 290-304.
106. Yuan Yi. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy / Yi. Yuan, M. Gao // Scientific Reports. – 2015. – V. 5. – P. 10259.
107. A Marine Isolate of *Bacillus pumilus* Secretes a Pumilacidin Active against *Staphylococcus aureus* / A. Saggese, R. Culurciello, A. Casillo [et al.] // Marine Drugs. – 2018. – V. 16. – №. 6. – P. 180.
108. Comparative genomic analyses reveal genetic characteristics and pathogenic factors of *Bacillus pumilus* HM-7 / Q. Wang, L. Zhang, Yi. Zhang [et al.] // Frontiers Microbiology. – 2022. – V. 13. – P. 1008648.
109. Iqbal S. Genome Mining and Comparative Genome Analysis Revealed Niche-Specific Genome Expansion in Antibacterial *Bacillus pumilus* Strain SF-4 / S. Iqbal, J. Vollmers, H.A. Janjua // Genes. – 2021. – V. 12. – №. 7. – P. 1060.
110. Пат. 2292326 Россияская Федерация. МПК51 C12N 1/20. Биопрепарат – нефтедеструктор / Архипченко И.А., Загвоздкин В.К., Заикин И.А., Иванов В.Г., Лукашев В.Н.; заявитель и патентообладатель ООО «Лукойл-Коми» – № 2005101367; заявл. 21.01.2005; опубл. 27.01.2007, Бюл. № 13. – 8 с.
111. Вспышки массового размножения и возбудители болезней осиновой хохлатки *Pheosia tremula* (Clerck) на юге Западной Сибири / В.П. Ходырев, А.М.

Чадинова, М.М. Исин [и др.] // Евразийский энтомологический журнал. – 2008. – Т. 7. – №. 4. – С. 373-376.

112. Оценка эффективности биотехнологий переработки органических отходов / С.Ю. Селивановская, Н.А. Чижикова, С.А. Ярлыченко [и др.] // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2009. – Т. 151. – №. 3. – С. 93-103.

113. Шах Махмуд Р. Противовирусная активность биназы в отношении вируса пандемического гриппа А (H1N1) / Р. Шах Махмуд, О.Н. Ильинская // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5. – №. 4. – С. 49-56.

114. Ильинская О.Н. Рибонуклеазы как противовирусные агенты / О.Н. Ильинская, Р. Шах Махмуд // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48. – №. 5. – С. 707-717.

115. Мохамед Х. Антагонистическая активность бактерий-ассоциантов побегов яблонь по отношению к фитопатогенным грибам / Х. Мохамед, А.М. Петерсон, Г.С. Ткаченко // Известия Саратовского университета. – 2016. – Т. 16. – №. 4. – С. 420-425.

116. Deep Functional Profiling of Wild Animal Microbiomes Reveals Probiotic *Bacillus pumilus* Strains with a Common Biosynthetic Fingerprint / M.N. Baranova, A.M. Kudzhaev, Yu.A. Mokrushina [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 3. – С. 1168.

117. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / E.G. Wulff, C.M. Mguni, K. Mansfeld-Giese [et al.] // Plant Pathology. – 2002. – V. 51. – P. 574-584.

118. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use / L.H. Duc, H.A. Hong, T.M. Barbosa [et al.] // ASM Journals. Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V. 70. – №. 4. – P. 2161-2171.

119. Safety and probiotic evaluation of two *Bacillus* strains producing antioxidant compounds / N. Kotowicz, R.K. Bhardwaj, W.T. Ferreira [et al.] // Beneficial Microbes. – 2019. – V. 10. – №. 7. – P. 759-771.

120. Lee N.-Ky. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier / N.-Ky. Lee, W.-S. Kim, H.-D. Paik // Food Science and Biotechnology. – 2019. – V. 28. – P. 1297-1305.

121. Effects of dietary *Bacillus pumilus* on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) / Ch. Zhao, J. Zhu, J. Hu [et al.] // Aquaculture Nutrition. – 2019. – V. 25. – Is. 3. – P. 712-720.

122. Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions / M. Bilal, W. Si, F. Barbe [et al.] // Poultry Science. – 2021. – V. 100. – №. 3. – P. 100871.

123. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations / G. Jiménez, M. Urdiain, A. Cifuentes [et al.] // Systematic and Applied Microbiology. – 2013. – № 36. – P. 383-391.

124. *Bacillus toyonensis* strain AEMREG6, a bacterium isolated from South African marine environment sediment samples produces a glycoprotein bioflocculant / K. Okaiyeto, U.U. NwOΠo, L.V. Mabinya [et al.] // Molecules. – 2015. – V. 20. – P. 5239-5259.

125. Mathew B.B. Screening and identification of bacteria isolated from industrial area groundwater to study lead sorption: Kinetics and statistical optimization of biosorption parameters / B.B. Mathew, N.B. Krishnamurthy // Groundwater for Sustainable Development. – 2018. – V. 7. – P. 313-327.

126. Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments / Y. Liu, Q. Lai, J. Du [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – №. 689. – P. 1-11.

127. Odeniyi O.A. Effects of media components and agricultural by-products on γ -polyglutamic acid production by *Bacillus toyonensis* As8 / O.A. Odeniyi, D.S. Avoseh // Polim Med. – 2018. – V. 48. – Is. 2. – P. 91-97.

128. Zhang Ch.-W. Diversity and probiotic activities of endophytic bacteria associated with the coastal halophyte *Messerschmidia sibirica* / Ch.-W. Zhang, X.-Yi. Tian, Ch.-Sh. Zhang // *Applied Soil Ecology*. – 2019. – №. 143. – P. 35-44.

129. Genome annotation and antimicrobial properties of *Bacillus toyonensis* VU-DES13, isolated from the *Folsomia candida* gut / V. Agamennone, J. Straalen, A. Brouwer [et al.] // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2019. – V. 167. – P. 269-285.

130. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens / R. Lopes, L. Cerdeira, G.S. Tavares [et al.] // *World J Microbiol Biotechnol*. – 2017. – V. 33. – №. 10. – P. 1-15.

131. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment / S.B. Deng, R.B. Bai, X.M. Hu [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. – 2003. – V. 60. – Is. 5. – P. 588-593.

132. Pinheiro V. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on the breeding performances of primiparous rabbit does / V. Pinheiro, J.L. Mourão, G. Jimenez // *World Rabbit Science*. – 2007. – V. 15. – P. 179-188.

133. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoi* preparation / L.D. Williams, G.A. Burdock, G. Jiménez [et al.] // *Regul Toxicol Pharmacol*, – 2009. – V. 55. – Is. 2. – P. 236-246.

134. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine / T.B. Roos, A.P. Lara, L.A. Dummer [et al.] // *Vaccine*. – 2012. – V. 9. – Is. 30(12). – P. 2173-2177.

135. Casanovas-Massana A. Quantification of tetracycline and chloramphenicol resistance in digestive tracts of bulls and piglets fed with Toyocerin, a feed additive containing *Bacillus toyonensis* spores / A. Casanovas-Massana, L. Sala-Comorera, A.R. Blanch // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – V. 173. – P. 59-65.

136. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets / D. Kantas, V.G. Papatsiros, P.D. Tassis [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2015. – V. 118. – Is. 3. – P. 727-738.

137. Characterization of antibiotic resistant and enzyme producing bacterial strains isolated from the Arabian Sea / P.N. Tallur, D.B. Sajjan, S.I. Mulla [et al.] // 3 Biotech. – 2016. – V. 6. – №. 1.
138. Nematicidal spore-forming Bacilli share similar virulence factors and mechanisms / Z. Zheng, J. Zheng, Z. Zhang [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – Ar. 31341. – P. 1-9.
139. Diversity, distribution, and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng* / Z.Y. Fan, C.P. Miao, X.G. Qiao [et al.] // Journal of Ginseng Research. – 2016. – V. 40. – №. 2. – P. 97-104.
140. Study of the ability of *Bacillus toyonensis* to interfere with the quorum-sensing systems of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 in the pig gut / G. González-Ortiz, D. Solà-Oriol, M. Cerdà-Cuellar [et al.] // Journal of Animal Science. – 2016. – V. 94. – №. 3. – P. 70-74.
141. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep / T.B. Roos, C.M. Moraes, R.T. Sturbelle [et al.] // Research in Veterinary Science. – 2018. – V. 117. – P. 260-265.
142. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5 / F.D.S. Santos, Y.A. Menegon, R.E.A. Piraine [et al.] // Beneficial Microbes. – 2017. – V. 9. – №. 1. – P. 133-142.
143. Choudhury P. Optimization of phytostimulatory potential in *Bacillus toyonensis* isolated from tea plant rhizosphere soil of Nilgiri Hills, India / P. Choudhury, A. Jawed, P. Saha // International Journal of Engineering Science Invention. – 2017. – V. 6. – Is. 11. – P. 13-18.
144. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* / F.Y. Rochaa, C.M. Oliveiraa, P.R. Silvaa, [et al.] // Applied Soil Ecology. – 2017. – V. 120. – P. 8-19.

145. The Identification of Intrinsic Chloramphenicol and Tetracycline Resistance Genes in Members of the *Bacillus cereus* Group (sensu lato) / H. Glenwright, S. Pohl, F. Navarro [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 7. – №. 2122. – P. 1-15.

146. Effective Role of Microorganisms in Livestock Development / D.R. Gunturu, M. Yegireddy, S. Mannem [et al.] // *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. – 2019. – P. 185-194.

147. Microbial inhabitants of agricultural land have potential to promote plant growth but they are liable to traditional practice of wheat (*T. aestivum* L) straw burning / A. Raheem, M. Sajid, M. Iqbal [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2019. – V. 18. – Ar. 101060. – P. 1-25.

148. Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112T / A. Abdulmawjood, J. Herrmann, S. Riede [et al.] // *PLoS One*. – 2019. – V. 14. – Is. 4. – P. 1-15.

149. Cabello F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment / F.C. Cabello // *Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 8. – №. 7. – P. 1137-1144.

150. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance / M. Reverter, S. Sarter, D. Caruso [et al.] // *Nature communications*. – 2020. – V. 11. – P. 1870.

151. Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia / D. Schar, Ch. Zhao, Yu Wang [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – V. 12. – P. 5384.

152. Harnessing the potentialities of probiotics, prebiotics, synbiotics, paraprobiotics, and postbiotics for shrimp farming / J.X. H. Goh, L.T.-H. Tan, J.W.-F. Law [et al.] // *Reviews Aquaculture*. – 2022. – V. 14. – P. 1478-1557.

153. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review / A. Rico, K. Satapornvanit, M.M. Haque [et al.] // *Reviews in Aquaculture*. – 2012. – V. 4. – Is. 2. – P. 75-93.

154. Prospects of development of aquaculture in Russia and its regions / Ly. Kalinina, I. Zelenskaya, S. Trufanova [et al.] // E3S Web of Conferences. – 2019. – V. 81. – №. 01008.

155. Устименко Е.А. Бактериальные инфекции у тихоокеанских лососей при искусственном воспроизводстве на камчатке: автореф. ... кандидата биологических наук: 03.02.06 / Устименко Елена Александровна. – Петропавловск-Камчатский, 2012. – 23 с.

156. Бунькова С.И. Фармако-токсикологическая характеристика аквапурина и его влияние на физиологические и экстерьерные показатели осетров: автореф. ... кандидата ветеринарных наук: 06.02.03 / Бунькова Софья Ильясовна. – Новосибирск, 2018. – 16 с.

157. Жандалгарова А.Д. Использование бактериальных препаратов «ферм-км» и «простор» в кормлении осетровых рыб: автореф. ... кандидата сельскохозяйственных наук: 06.02.08 / Жандалгарова Аделя Джуманияшевна. – Усть-Кинельский, 2017. – 19 с.

158. Ткачева И.В. Научно-практическое обоснование использования биофлавоноидов, водорастворимых полисахаридов, пробиотических препаратов в птицеводстве и прудовом рыбоводстве: автореф. ... доктора биологических наук: 06.02.10 / Ткачева Ирина Васильевна. – Волгоград, 2019. – 48 с.

159. Сариев Б.Т. Оптимизация кормления осетровых рыб в условиях установки замкнутого водообеспечения: автореф. ... кандидата биологических наук: 06.04.01 / Сариев Бекбол Токесович. – Новосибирск, 2012. – 23 с.

160. Никитина А.П. Ветеринарно-санитарная оценка ленского осетра, выращенного с применением биогенной кормовой добавки аква-biot-norm; автореф. ... кандидата ветеринарных наук: 06.02.05 / Никитина Анна Петровна. – Чебоксары, 2019. – 20 с.

161. Шульга Е.А. Пробиотики в кормлении осетровых рыб при товарном выращивании: автореф. ... кандидата биологических наук: 03.00.10 / Шульга Елена Александровна. – Астрахань, 2009. – 24 с.

162. Сементина Е.В. Влияние пробиотика «Субтилис» на гематологические показатели разновозрастной стерляди, выращиваемой в установке с замкнутым водоснабжением / Е.В. Сементина, Г.Г. Серпунин // Труды VIII междунар. науч. конф. «Инновации в науке и образовании- 2010», посвященной 80-летию образования университета. – Калининград: Изд-во КГТУ. – 2010. – С. 118-121.

163. Сементина Е.В. Ихтиогематологические показатели как критерий условий выращивания и обитания рыб: автореф. ... кандидата биологических наук: 03.06.02 / Сементина, Евгения Владимировна. – Калининград, 2011. – 23 с.

164. Артеменков Д.В. Выращивание клариевого сома (*Clarias gariepinus*) на комбикормах с добавками пробиотика субтилис в условиях УЗВ: автореф. ... кандидата сельскохозяйственных наук: 06.04.01 / Артеменков, Дмитрий Владимирович. – Москва, 2013. – 23 с.

165. Грозеску Ю.Н. Инновационные методы повышения эффективности кормления осетровых рыб на основе использования в рационах нетрадиционного кормового сырья и биологически активных препаратов: автореф. ... доктора сельскохозяйственных наук: 06.02.08 / Грозеску Юлия Николаевна. – Усть-Кинельский, 2016. – 33 с.

166. Isolation of potential probiotic *Bacillus spp.* and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* / Dh. Ramesh, A. Vinothkanna, A.K. Rai [et al.] // Fish Shellfish Immunology. – 2015. – V. 45. – №. 2. – P. 268-276.

167. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers / A.T.V. Nguyen, D.V. Nguyen, M.T. Tran [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2015. – V. 60. – P. 580-588.

168. Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces / A. Adetoye, E. Pinloche, B.A. Adeniyi [et al.] // BMC Microbiology. – 2018. – V. 18. – №. 1. – P. 1-11.

169. Mingmongkolchai S. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production / S. Mingmongkolchai, W. Panbangred // Journal of Applied Microbiology. – 2018. – V. 124. – P. 1334-1346.

170. Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gut of *Cyprinus carpio* That May Be Effective Against Lead Toxicity / S.S. Giri, J.W. Jun, S. Yun [et al.] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2019. – V. 11. – P. 65-73.

171. Advantages of *Bacillus*-based probiotics in poultry production / U. Ramlucken, R. Laloo, Y. Roets [et al.] // Livestock Science. – 2020. – V. 241. e104215.

172. Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: a review / F. Khalid, A. Khalid, Yu. Fu [et al.] // Journal of Microbiology. – 2021. – V. 59. – №. 7. – P. 627-633.

173. The Detection of Potential Native Probiotics *Lactobacillus spp.* against *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis* and *Salmonella kentucky* ST198 of Lebanese Chicken Origin / R.E. Hage, J.E. Hage, S.P. Snini [et al.] // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – P. 1147.

174. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth / S. Rengpipat, W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul [et al.] // Aquaculture. – 1998. – V. 167. – Is. 3-4. – P. 301-313.

175. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture / L. Verschuere, G. Rombaut, P. Sorgeloos [et al.] // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2000. – V. 64. – №. 4. – P. 655-671.

176. The Potential of *Daphnia magna* Bioencapsulated with Probiotics Bacilli on Growth and Feeding Parameters of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Larvae / M. Faramarzi, H. Jafaryan, R. Patimar [et al.] // World Journal of Zoology. – 2011. – V. 6. – №. 3. – P. 268-273.

177. Copper and temperature modify microbial communities, ammonium and sulfate release in soil / R. Ferreira, H. Gaspar, J.M. Gonzalez [et al.] // Journal of Plant Nutrition and Soil Science. – 2015. – V. 178. – №. 6. – P. 953-962.

178. Chapman C.M.C. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? / C.M.C. Chapman, G.R. Gibson, I. Rowland // *European Journal of Nutrition*. – 2011. – V. 50. – P. 1-17.

179. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) / B.R. Beck, D. Kim, J. Jeon [et al.] // *Fish Shellfish Immunology*. – 2015. – V. 42. – №. 1. – P. 177-183.

180. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* / Yu. Xia, M. Lu, G. Chen [et al.] // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2018. – V. 76. – P. 368-379.

181. Сираева З.Ю. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида Бацизулин / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, О.Н. Ильинская // *Ученые записки казанского университета. Естественные науки*. – 2010. – Т. 152. – №. 4. – С. 169-178.

182. Фирсова М.С. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum* / М.С. Фирсова, В.А. Евграфова, А.В. Потехин // *Ветеринария сегодня*. – 2019. – Т. 29. – №. 2. – С. 12-16.

183. 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 [и др.] // *Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2021. – Т. 11. – №. 3. – С. 393-402.

184. Huang X. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* / X. Huang, H. Zhou, H. Zhang // *Fish Shellfish Immunology*. – 2006. – V. 20. – P. 750-757.

185. Chandrakala N. Role Of Probiotics in aquaculture- a review / N. Chandrakala, G. Soundharanayaki // *International Journal of Current Innovation Research*. – 2017. – V. 3. – Iss. 2. – P. 577-582.

186. Руденко Р.А. Биотехнология водорослей в аквакультуре / Р.А. Руденко, И.В. Ткачева // Международный научно-исследовательский журнал. – 2021. – Т. 110. – №. 8. – С. 136-138.
187. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*) / A. Gildberg, H. Mikkelsen, E. Sandaker [et al.] // Hydrobiologia. – 1997. – №. 352. – P. 279-285.
188. Hai N.V. Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) / N.V. Hai, N. Buller, R. Fotedar // Aquaculture Research. – 2009. – V. 40. – P. 590-602.
189. Hai N.V. The use of probiotics in aquaculture / N.V. Hai // Journal of Applied Microbiology. – 2015. – V. 119. – P. 917-935.
190. Benefits of using the probiotic Efinol®L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon / L.C. Gomes, R.P. Brinn, J.L. Marcon [et al.] // Aquaculture Research. – 2009. – V. 40. – P. 157-165.
191. Буяров В.С. Эффективность применения биологически активных добавок в рыбоводстве / В.С. Буяров, Ю.А. Юшкова // Вестник ОрелГАУ. – 2016. – Т. 60. – №. 3. – С. 30-39.
192. Ткачёва И.В. Экономическая целесообразность применения пробиотиков при выращивании карпа / И.В. Ткачёва // Деловой. – 2017. – №. 4. – С. 36-37.
193. Пробиотики в аквакультуре / Е.А. Котова, Н.А. Пышманцева, Д.В. Осепчук [и др.] // Сельскохозяйственный журнал. – 2012. – С. 1-4.
194. New bacilli-based probiotic for aquaculture: efficacy study on *Macrobrachium rosenbergii* / A. Malkova, I. Evdokimov, M. Shirmanov [et al.] // BIO Web of Conferences. – 2022. – V. 42. e01011.
195. Самсонова А.С. Оптимизация условий глубинного культивирования микроорганизмов-деструкторов жировых веществ / А.С. Самсонова // Весці нацыянальнай акадэміі навук беларусі серыя біялагічных навук. – 2014. – №. 4. – С. 63-33.

196. Пискаева А.И. Оптимизация параметров культивирования консорциума микроорганизмов – деструкторов кератина в биотехнологических целях / А.И. Пискаева, А.Ю. Просеков // Известия иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2016. – Т. 16. – С. 53-61.

197. Lao W.Ch. Optimization of major environmental parameters to degrade scrap tyres by *Bacillus* sp. / W.Ch. Lao, R.A. Toledo, H. Shim // Energy Procedia. – 2018. – V. 153. – P. 226-230.

198. Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for the Production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146 / N. Shafee, S.N. Aris, R.N.Z. Rahman [et al.] // Journal of Applied Sciences Research. – 2005. – V. 1. – №. 1. – P. 1-8.

199. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed / M. Ye, L. Sun, R. Yang [et al.] // Royal Society open science. – 2017. – V. 4. – P. 171012.

200. Nguyen H.-Ye. Optimization of Fermentation Conditions and Media for Production of Glucose Isomerase from *Bacillus megaterium* Using Response Surface Methodology / H.-Ye. Nguyen, G.-B. Tran // Hindawi Scientifica. – 2018. – P. 1-11.

201. Pat. CN104911120A China, C 12 N 1/20, C 12 R 1/125. *Bacillus subtilis* fermentation production technology / Wei Ch., Haimin Ch., Zongsuo L., Qing Sh., Jianlin Ya., Hairong W., Xiufang H., Lili L.; Current Assignee Zhejiang University of Technology ZJUT. – №. 201510105687; Application filed 11.03.2015; Publication 16.09.2015. – 5 p.

202. Оптимизация состава среды для культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов / Д.С. Борисовец, Е.С. Журавлева, Т.А. Зуйкевич [и др.] // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2020. – Т. 2. – С. 3-12.

203. Пат. 2678133 Российская Федерация, МПК51 C 12 N 1/20, C 12 Q 1/04, C 12 R 1/38. Питательная среда для культивирования *Pseudomonas fluorescens* AP-33 / Яценко Е.С., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю., Бойко С.С., Дурникин Д.А.;

заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2018100387; заявл. 09.01.2018; опубл. 23.01.2019, Бюл. № 3. – 8 с.

204. Пат. 2668178 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С 12 R 1/125. Питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* / Рыженков Н.С., Яценко Е.С., Микушина И.В., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2018100936; заявл. 10.01.2018; опубл. 26.09.2018, Бюл. № 27. – 6 с.

205. Пат. 2680702 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С 12 R 1/125. Питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 / Питайкина А.О., Яценко Е.С., Ильина Е.Г., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2017144487; заявл. 06.12.2017; опубл. 25.02.2019, Бюл. № 6. – 7 с.

206. Пат. 2668173 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С 12 R 1/125. Питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 / Рыженков Н.С., Яценко Е.С., Микушина И.В., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2017144484; заявл. 18.12.2017; опубл. 26.09.2018, Бюл. № 27. – 5 с.

207. Rajendhran J. Optimization of a fermentation medium for the production of Penicillin G acylase from *Bacillus sp.* / J. Rajendhran, V. Krishnakumar, P. Gunasekaran // Letters in Applied Microbiology. – 2002. – V. 35. – P. 523-527.

208. Optimization of fermentation medium compositions from dewatered wastewater sludge of beer manufactory for *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin production / N.Th. Hoa, T.Th. Chinh, D.Th.M. Anh [et al.] // American Journal of Agriculture and Forestry. – 2014. – V. 5. – №. 2. – P. 219-225.

209. Anakwenze V.N. Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus thuringiensis* EC1 for Enhanced Methionine Production / V.N. Anakwenze, C.C. Ezemba, I.A. Ekwealor // Advances in Microbiology. – 2014. – №. 4. – P. 344-352.

210. Optimization of fermentation medium for acetoin production by *Bacillus subtilis* sf4-3 using Statistical methОPs / Y. Tian, Y. Fan, X. Zhao [et al.] // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – V. 44. – №. 5. – P. 529-543.

211. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose / R. Wu, G. Chen, Sh. Pan [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – P. 6824.

212. Калмыкова Г.В. Повышение бактериоциноподобной активности штамма *Bacillus thuringiensis* путем улучшения состава питательной среды / Г.В. Калмыкова, А.Ф. Чешкова, Н.И. Акулова // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2020. – Т. 50. – №. 2. – С. 47-56.

213. *Bacillus subtilis* High Cell Density Fermentation Using a Sporulation-Deficient Strain for the Production of Surfactin / P. Klausmann, K. Hennemann, M. Hoffmann [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2021. – V. 105. – P. 4141-4151.

214. Беленькая С.В. Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* / С.В. Беленькая, В.В. Ельчанинов, Д.Н. Щербаков // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – №. 5. – С. 20-27.

215. Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum* / I. Shahzadi, M.A. Al-Ghamdi, M.Sh. Nadeem [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – V. 11. – P. 7145.

216. Maeda M. Microbial Processes in Aquaculture Environment and Their Importance for Increasing Crustacean Production / M. Maeda, I.Ch. Liao // JARQ. – 1994. – V. 28. – P. 283-288.

217. A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*) / M. Contreras, P.D. Loeza, J. Villegas [et al.] // Genetics and Molecular Research. – 2016. – V. 15. – P. 1-10.

218. Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. Biloxi) growth-promoting bacterium / M. Contreras-Perez, J.H. Salmeron, D. Rojas-Solis [et al.] // 3 Biotech. – 2019. – V. 9. – P. 1-6.

219. Hemolysin BL from novel *Bacillus toyonensis* BV-17 induces antitumor activity both in vitro and in vivo / J. Chen, Sh. Hu, D. Ji [et al.] // Gut microbes. – 2020. – V. 12. – №. 1. e1782158. – P. 1-15.

220. The mitigating role of probiotics against the adverse effects of suboptimal temperature in farmed fish: A review / M.A.E. Naiel, A.M. Shehata, A.I. El-Kholy [et al.] // *Aquaculture*. – 2022. – V. 550. e737877.

221. Effect of a new probiotic on *Artemia* cysts determined by a convolutional neural network / I.Yu. Evdokimov, A.V. Malkova, A.N. Irkitova [et al.] // *Foods and Raw Materials*. – 2024. – V. 12. №. 1. – P. 91-100.

222. ГОСТ 31861-2012 Межгосударственный стандарт. Вода. Общие требования к отбору проб. – М.: Стандартинформ. 2019. – 36 с.

223. ГОСТ Р 52501-2005 (ИСО 3696:1987) Национальный стандарт российской федерации. Вода для лабораторного анализа. – М.: Стандартинформ. 2008. – 13 с.

224. СП 1.2.731-99 Санитарные правила. 1.2. Эпидемиология. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999. – 107 с.

225. МУ 2.1.4.1057-01 Методические указания. 2.1.4. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001. – 93 с.

226. МУ 287-113 Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения. – М.: ФГУП "Интерсэн", 2000. – 57 с.

227. ГОСТ 10444.1-84 Межгосударственный стандарт. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. – М.: Стандартинформ. 2010. – 18 с.

228. Бойко С.С. Влияние ультразвука на численность *Bacillus subtilis* в процессе стационарного культивирования / С.С. Бойко, Е.С. Яценко // *Материалы и технологии XXI века: Доклады IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов*. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та. – 2017. – С. 322-325.

229. ГОСТ 28085-2013 Межгосударственный стандарт. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы контроля стерильности. – М.: Стандартинформ. 2014. – 26 с.

230. МУК 4.2.2316-08 Методические указания. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.

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

232. Пат. 2675934 Россияская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, А 61 К 35/742, С 12 R 1/07. Комбинированный пробиотический препарат на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* (варианты) для использования в животноводстве, способ его производства (варианты) и штамм *Bacillus subtilis* (natto), используемый в качестве добавки к препарату / Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Воинова Т.М., Карташов М.И., Овчинников А.И.; заявитель и патентообладатель ООО «Фермлаб» – № 2017112086; заявл. 10.04.2017; опубл. 25.12.2018, Бюл. № 28. – 22 с.

233. Грачева И.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред / И.В. Грачева, А.В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №. 3. – С. 5-12.

234. Асташкина А.П. анализ микрофлоры воздуха и воды / А.П. Асташкина. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета. – 2015. – 25 с.

235. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – М.: Академия. – 2005. – 608 с.

236. МР 2.3.2.2327-08 2.3.2 Пищевые продукты и пищевые добавки. Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с

атласом значимых микроорганизмов). – М.: ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии. 2008. – 243 с.

237. ГОСТ ISO 7218-2015 Межгосударственный стандарт. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям. – М.: Стандартинформ. 2016. – 70 с.

238. Tadesse A. Medical Bacteriology. Lecture notes / A. Tadesse, M. Alem. – University of Gondar. – 2006. – 444 p.

239. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology / M. Bonnet, J.C. Lagier, D. Raoult [et al.] // New Microbe and New Infection. – 2020. – V. 34. – P. 100622.

240. Иркитова А.Н. Оптимизация метода определения антагонистической активности пробиотических бактерий / А.Н. Иркитова, Е.С. Яценко // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания. – 2017. – №. 5. – С. 113-117.

241. Отчет о работе, выполненной по Договору услуги № 11/2017 от 17.11. 2017 по определению антибиотической активности 23-х штаммов бактерий, предоставляемых Заказчиком, относительно 10-ти патогенных тест-штаммов из состава Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Отв. И.С. Андреева. – 2017. – С. 1-25.

242. Изучение антибиотикочувствительности нового ризосферного штамма *Bacillus pumilus* В-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства / Т.Н. Орлова, А.Н. Иркитова, А.В. Гребенщикова [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2020. – Т. 183. – №. 1. – С. 111-115.

243. Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске / А.В. Бардашева, Н.В. Фоменко, Т.В. Калымбетова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – №. 2. – С. 234-245.

244. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.

245. Correlation of Metabolic Profiles of Plasma and Cerebrospinal Fluid of High-Grade Glioma Patients / A.D. Rogachev, N.A. Alemasov, V.A. Ivanisenko [et al.] // *Metabolites*. – 2021. – V. 11. – №. 133. – P. 1-13.

246. Прудникова С.В. Микробиология с основами вирусологии: методы микрoэкологического исследования наземных, водных и воздушных экосистем / С.В. Прудникова, Н.Д. Сорокин, Н.И. Сарматова, Н.Н. Реммель. – Красноярск: ИПК СФУ. – 2008. – 151 с.

247. Машанов А.И. Микробиология с основами биотехнологии / А.И. Машанов, Н.А. Величко, Ж.А. Плынская. – Красноярск: Краснояр. гос. аграр. ун-т. – 2015. – 168 с.

248. Ильин Д.Ю. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции / Д.Ю. Ильин, Г.В. Ильина. – Пенза: РИО ПГСХА. – 2016. – 116 с.

249. 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 [и др.] // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. – 2022. – Т. 18. – №. 3. – С. 20-27.

250. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов. – М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.

251. Отчет о научно-исследовательской работе по договору № 10/22Н от 23.03.2022 по теме: «Токсикологическое изучение пробиотических препаратов», ФГБНУ ФАНЦА. Отв. Н.Ю. Беяева. – 2022. – С. 1-8.

252. Baert P. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture / Baert P., Bosteels T., Sorgeloos P. Pond production. In P. Lavens & P. Sorgeloos (Eds.). – FAO Press. – 1996. – P. 196-251.

253. Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н., Малкова А.В. Опыт разработки биологических препаратов для сельского хозяйства ИЦ «Промбиотех» // *Аграрная наука – сельскому хозяйству: сборник материалов: в 2 кн. / XVIII Международная научно-практическая конференция (9-10 февраля 2023 г.), приуроченная к 80-летию Алтайского ГАУ*. – Барнаул: РИО Алтайского ГАУ, 2023. С. 151-153.

254. New M.B. Farming freshwater prawns. A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) / M.B. New // FAO Press. Rome. – 2002. – P. 215.

255. Жигин А.В. Гигантская пресноводная креветка как объект индустриальной аквакультуры / А.В. Жигин, Н.П. Ковачева, Р.О. Лебедев // ЭИ ВНИЭРХ, сер. Прибрежное рыболовство и аквакультура. – 2004. – С. 13-31.

256. Сапожников В.В. Руководство по химическому анализу морских и пресных вод при экологическом мониторинге рыбохозяйственных водоемов и перспективных для промысла районов Мирового океана / В.В. Сапожников, А.И. Агатова, Н.В. Аржанова, Н.В. Мордасова, Н.М. Лапина, В.Л. Зубаревич, О.Н. Н.И. Лукьянова, Торгунова. – М.: ВНИРО. – 2003. – 202 с.

257. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health / T. Li, Zh. Wang, J. Guo [et al.] // Science of The Total Environment. – 2023. – V. 860. 160461.

258. Antibiotic resistance among commercially available probiotics / P. Sharma, S.K. Tomar, P. Goswami [et al.] // Food Research International. – 2014. – V. 57. – P. 176-195.

259. Prevalence, Genetic Diversity, and Antibiotic Resistance of *Bacillus cereus* Isolated from Korean Fermented Soybean Products / Ch.-W. Kim, S.-H. Cho, S.-H. Kang [et al.] // Food Microbiology & Safety. – 2015. – V. 80. – №. 1. – P. 123-128.

260. The prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from foodstuffs / J. Schlegelova, J. Brychta, E. Klimova [et al.] // Veterinary Medicine – Czech. – 2003. – V. 48. – №. 11. – P. 331-338.

261. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets / G. Fiedler, C. Schneider, E.O. Igbinosa [et al.] // BMC Microbiology. – 2019. – V. 19. – P. 250.

262. Antibiotic resistance pattern of the allochthonous bacteria isolated from commercially available spices / Év. György, Év. Laslo, M. Antal [et al.] // Food Science Nutrition. – 2021. – V. 9. – P. 4551-4561.

263. The use of chromatographic techniques for the separation and the identification of insect lipids / M. Cerkowniak, A. Puckowski, P. Stepnowski [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2013. – V. 937. – P. 67-78.

264. A Simple and Effective Isocratic HPLC Method for Fast Identification and Quantification of Surfactin / M.Q.E. Mubarak, A.R. Hassan, A. Hamid [et al.] // Sains Malaysiana. – 2015. – V. 44. – №. 1. – P. 115-120.

265. *Bacillus cereus* Group-Type Strain-Specific Diagnostic Peptides / S. Pfrunder, J. Grossmann, P. Hunziker [et al.] // Journal of Proteome Research. – 2016. – V. 15. – №. 9. – P. 3098-3107.

266. Unrean P. Metabolic pathway analysis and kinetic studies for production of nattokinase in *Bacillus subtilis* / P. Unrean, N.H.A. Nguyen // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2012. – V. 36. – №. 1. – P. 45-56.

267. Crécy-Lagard V. Newly-discovered enzymes that function in metabolite damage-control / V. Crécy-Lagard, D. Haas, A.D. Hanson // Current Opinion in Chemical Biology. – 2018. – V. 47. – P. 101-108.

268. Влияние дихлородиамминплатины на димеризацию бычьего сывороточного альбумина в растворе / Е.В. Чихиржина, И.А. Белая, Ю.Г. Баранова [и др.] // Вестник СПбГУ. Физика и химия. – 2017. – Т. 4. – №. 1. С. 46-58.

269. Оддепалли Р. Выделение, очистка и характеристика стабильного дефенсин-подобного противогрибкового пептида из семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитника) / Р. Оддепалли, Л. Гурупрасад // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – №. 3. – С. 399-411.

270. Федорцов Н.М. Оценка стабильности комплекса бычьего сывороточного альбумина с галловой кислотой по данным электрофореза / Н.М. Федорцов, Р.О. Будкевич // Сборник тезисов IX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» в рамках III международного симпозиума «Инновации в пищевой биотехнологии». – 2021. – Т. 1. – С. 499-500.

271. Колодязная В.А. Биотехнология / В.А. Колодязная, М.А. Самотруева. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2020. – 384 с.

272. Станишевский Я.М. Промышленная биотехнология лекарственных средств / Я.М. Станишевский. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2021. – 144 с.

273. Винаров А.Ю. Процессы и аппараты биотехнологии. Ферментационные аппараты. 2-е издание / А.Ю. Винаров, Л.С. Гордеев, А.А. Кухаренко, В.И. Панфилов Под ред. В.А. Быкова. – М.: ЮРАЙТ. – 2022. – 274 с.

274. Гребенщикова А.В. Подбор условий культивирования для бактерий рода *Bacillus* / А.В. Гребенщикова // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета: материалы VII региональной молодежной конференции «Мой выбор — НАУКА!». – 2020. – С. 3-5.

275. Пат. 2799554 Российская Федерация, МПК51 А 61 К 35/742, 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 / Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е., Дементьев Д.В.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2022108049; заявл. 25.03.2022; опубл. 06.07.2023, Бюл. № 19. – 9 с.

276. Пат. 2309982 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, А 23 С 9/12, С 12 R 1/15. Способ получения бактериального концентрата пропионовокислых бактерий *P. shermanii* / Хамагаева И.С., Тумурова С.М.; заявитель и патентообладатель Вост.-Сиб. гос. техн. ун-т. – № 2005117901; заявл. 09.06.2005; опубл. 10.11.2007, Бюл. № 35. – 14 с.

277. Блажевич О.В. Культивирование клеток: Курс лекций / О.В. Блажевич. – Минск: БГУ. – 2004. – 78 с.

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

279. Евдокимов И. Ю., Иркитова А. Н., Малкова А. В., Ширманов М. В. Подбор оптимальной температуры глубинного культивирования природных штаммов рода *Bacillus*. IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и

биоинформатиков — 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2022. С. 147-148.

280. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations / M. Mansour, D. Amri, A. Bouttefroy [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 1999. – V. 86. – P. 311-324.

281. Matseliukh E.V. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* probiotic strains as protease producers / E.V. Matseliukh, L.A. Safronova, L.D. Varbanets // Biotechnologia acta. – 2015. – V. 8. – №. 2. – P. 84-90.

282. Lincoln L. Comparative evaluation of extracellular b-D-fructofuranosidase in submerged and solid-state fermentation produced by newly identified *Bacillus subtilis* strain / L. Lincoln, S.S. More // Journal of Applied Microbiology. – 2018. – V. 125. – P. 441-456.

283. Effects of solution pH and Ions on suicidal germination of *Bacillus subtilis* spores induced by medium high temperature-medium high hydrostatic pressure treatment / K. Morimatsu, Yo. Nakaura, T. Inaoka [et al.] // Biocontrol Science. – 2019. – V. 24. – №. 3. – P. 167-172.

284. Мартынова К.В. Бактериологическая идентификация бактерий *Bacillus coagulans*, выделенных из томатов и томатосодержащих продуктов питания / К.В. Мартынова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2019. – Т. 42. – №. 2. – С. 9-13.

285. Optimization of Culture Conditions for Protease Production using Three Strains of *Bacillus* / C.J. Morabandza, V. Dibangou, F.A.S. Mabika [et al.] // Journal of Pure and Applied Microbiology. – 2021. – V. 15. – №. 2. – P. 621-629.

286. Xylanase from thermotolerant *Bacillus haynesii* strain, synthesis, characterization, optimization using Box-Behnken Design, and biobleaching activity / M.M. Bakry, S.S. Salem, H.M. Atta [et al.] // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2022. – P. 1-14.

287. Влияние уровня pH на показатели глубинного культивирования пробиотических штаммов *Bacillus* / И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова [и др.] // Ползуновский вестник. – 2023. – №. 1. – С. 29-36.

288. ГОСТ 24061-2012 Межгосударственный стандарт. Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения массовой доли влаги. – М.: Стандартинформ. 2014. – 16 с.

289. ГОСТ 31928-2013 Межгосударственный стандарт. Средства лекарственные для ветеринарного применения пробиотические. Методы определения пробиотических микроорганизмов. – М.: Стандартинформ. 2014. – 19 с.

290. ГОСТ 31674-2012 Межгосударственный стандарт. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. – М.: Стандартинформ. 2014. – 30 с.

291. ГОСТ Р 55291-2012 Национальный стандарт российской федерации. Средства лекарственные пробиотические для ветеринарного применения. Методы микробиологического анализа. – М.: Стандартинформ. 2014. – 16 с.

292. ГОСТ Р 54063-2010 Национальный стандарт российской федерации. Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности. – М.: Стандартинформ. 2011. – 17 с.

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

294. Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н. Разработка инновационных биологических препаратов на основе природных штаммов рода *Bacillus*. VIII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие»: сборник тезисов. М.: ГЕОС. – 2022. – С. 238-240.

295. Особенности роста пробиотических культур в составе поливидового консорциума / Н.Е. Рябая, Н.А. Головнева, А.А. Самарцев [и др.] // IX

международная научная конференция микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Минск. – 2015. – С. 46-47.

296. In vitro co-cultures of human gut bacterial species as predicted from co-occurrence network analysis / P. Das, B. Ji, P. Kovatcheva-Datchary [et al.] // PLoS One. – 2018. – V. 13. – №. 3. e0195161.

297. Авдеева Л.В. Биосинтез целлюлаз пробиотическими штаммами *Bacillus subtilis* при совместном выращивании / Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, М.А. Хархота // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – №. 4. – С. 80-89.

298. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М.: Стандартиформ. 2007. – 7 с.

299. Teresita D.N.J. Biomass production and nutritional value of *Artemia sp.* (Anostraca: Artemiidae) in Campeche, México / D.N.J. Teresita, M. Maldonado, G.R.-C. Leticia // Revista de Biología Tropical. – 2005. – V. 53. – №. 3-4. – P. 447-454.

300. Hamsah W. The nutritional value of *Artemia sp.* enriched with the probiotic *Pseudoalteromonas piscicida* and the prebiotic mannan-oligosaccharide / W. Hamsah, Y.M. Alimuddin, Jr.M. Zairin // AACL Bioflux. – 2017. – V. 10. – №. 1. – P. 8-17.

301. New M.B. Freshwater Prawn Culture: The Farming of *Macrobrachium rosenbergii* / M.B. New, W.C. Valenti. – Oxford, England: Blackwell Science. – 2001. – 464 p.

302. Freshwater Prawns: Biology and Farming / J.H. Brown, M.B. New, D. Ismael [et al.] // – 2010. – P. 18-39.

303. Chronic effects of nitrogenous compounds on survival and growth of juvenile pink shrimp / W.J. Wasielesky, L.H. Poersch, T.G. Martins [et al.] // Brazilian Journal of Biology. – 2017. – V. 77. – №. 3. – P. 558-565.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Акты проведения промышленных испытаний

Общество с ограниченной ответственностью «Арсал»
Соклаков Максим Петрович
ОГРН 1022200883715 ИНН 2211003011
658839, Россия, Алтайский край, Славгородский район
г. Яровое, ул. Гагарина, 1С
тел. +7(3856)82-52-54

АКТ

о передаче образца опытного пробиотика

14 марта 2022 г.

Мы, нижеподписавшиеся, генеральный директор ООО «Арсал» Соклаков М.П., директор по развитию ООО «Арсал» Дементьев Д.В., ведущий научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» Иркитова А.Н. и младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» Евдокимов И.Ю. составили настоящий акт о том, что 14 марта 2022 года Евдокимов И.Ю. передал Дементьеву Д.В. образец опытного пробиотика, в размере 1 кг, для проверки воздействия пробиотика на выклев цист Артемии. Проведение испытаний планируется в лаборатории ООО «Арсал», расположенной в г. Яровое Алтайского края.

Подписи:

Генеральный директор
ООО «Арсал»Директор по развитию
ООО «Арсал»В.н.с. ИЦ «Промбиотех»
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»М.н.с. ИЦ «Промбиотех»
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»


/Соклаков М.П.
Дементьев Д.В.
Иркитова А.Н.
Евдокимов И.Ю.

Общество с ограниченной ответственностью «Арсал»
Соклаков Максим Петрович
ОГРН 1022200883715 ИНН 2211003011
658839, Россия, Алтайский край, Славгородский район
г. Яровое, ул. Гагарина, 1С
тел. +7(3856)82-52-54

АКТ

проведения испытаний образца опытного пробиотика на цистах рачков Артемии

14 марта 2022 г.

Мы, нижеподписавшиеся, генеральный директор ООО «Арсал» Соклаков М.П., директор по развитию ООО «Арсал» Дементьев Д.В., ведущий научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» Иркитова А.Н. и младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» Евдокимов И.Ю. составили настоящий акт о том, что 14 марта 2022 года в лаборатории ООО «Арсал» была произведена обработка двух партий рачков Артемии (Z29.04 (озеро Большое Яровое), С9 (озеро Кучук)) с целью исследования влияния на выклев и общий выход биомассы Артемии.

Для обработки были использованы навески сухого пробиотика в размере 0,05 г/2г цист, 0,1 г/2 г цист, 0,2 г/2 г цист в инкубационных конусах. Планируемая повторность эксперимента – 5 раз.

Подписи:

Генеральный директор
ООО «Арсал»Директор по развитию
ООО «Арсал»В.н.с. ИЦ «Промбиотех»
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»М.н.с. ИЦ «Промбиотех»
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»


/Соклаков М.П.
Дементьев Д.В.
Иркитова А.Н.
Евдокимов И.Ю.

Общество с ограниченной ответственностью «Арсал»
Соклаков Максим Петрович
ОГРН 1022200883715 ИНН 2211003011
658839, Россия, Алтайский край, Славгородский район
г. Яровое, ул. Гагарина, 1С
тел. +7(3856)82-52-54

АКТ

проведения исследований результатов обработки опытным пробиотиком цист рачков Артемии

28 марта 2022 г.

Мы, нижеподписавшиеся, генеральный директор ООО «Арсал» Соклаков М.П., директор по развитию ООО «Арсал» Дементьев Д.В., ведущий научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» Иркитова А.Н. и младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» Евдокимов И.Ю. составили настоящий акт о том, что 28 марта 2022 года в лаборатории ООО «Арсал» было проведено исследование обработанных двух партий рачков Артемии (Z29.04 (озеро Большое Яровое), С9 (озеро Кучук)) новым опытным пробиотиком в пятикратной повторности. Целью исследования было определение влияния нового пробиотика на выклев и суммарный выход биомассы Артемии.

Вывод: в результате проведенных испытаний данного препарата отмечен положительный эффект на процент выклева цист (до 9,5% выше по сравнению с контролем) и больший выход биомассы артемии (на 44(±4)% или на 2,15(±0,05) г больше по сравнению с контролем).

Рекомендации: наилучшие результаты зафиксированы при добавлении навески в 0,1 г пробиотика к 2 г цист, поэтому наиболее эффективной дозой при использовании данного пробиотика на рачках Артемии считать именно ее. Для улучшения показателей выклева и выхода биомассы использовать данный пробиотик.

Подписи:

Генеральный директор
ООО «Арсал»Директор по развитию
ООО «Арсал»В.н.с. ИЦ «Промбиотех»
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»М.н.с. ИЦ «Промбиотех»
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»


/Соклаков М.П.
Дементьев Д.В.
Иркитова А.Н.
Евдокимов И.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Справка о депонировании *B. toyonensis* В-13249

ВКПМ 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

13249

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

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


Bacillus toyonensis 15


Дата депонирования: 3 декабря 2018 года

Депозитор: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
Продуцент антибиотических соединений

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-13249

Директор БРЦ ВКПМ
Проф.  Синеокий С.П.


Справка о депонировании *B. pumilus* В-13250

ВКПМ 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

13250

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

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


Bacillus pumilus 16


Дата депонирования: 3 декабря 2018 года

Депозитор: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
Продуцент антибиотических соединений

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-13250

Директор БРЦ ВКПМ
Проф.  Синеокий С.П.



Одинаковые метаболиты обеих культур

№	Sample Name	Medium (M)	<i>B. toyonensis</i> B-13249 (M)	<i>B. pumilus</i> B-13250 (M)	Medium vs <i>B. toyonensis</i> B-13249*	Medium vs <i>B. pumilus</i> B-13250*
1	2-Hydroxy-3-methylbutyric acid_neg	1,46E+06	3,82E+06	4,18E+07	1,42E-03	4,22E-05
2	N-acetyl-glutamate_pos	2,55E+06	6,61E+06	9,21E+06	1,14E-03	7,22E-04
3	N-acetyl spermidine_pos	6,18E+05	6,60E+06	2,84E+06	1,08E-02	1,45E-02
4	2-Hydroxyglutarate_neg	2,75E+06	6,03E+06	3,23E+07	1,66E-03	8,58E-03
5	Quinolinic Acid_neg	1,75E+06	3,21E+06	2,50E+06	9,17E-03	2,84E-03
6	2-Octenoylcarnitine_pos	4,21E+05	6,87E+05	8,19E+05	1,81E-03	2,37E-03
7	Phenylpyruvate_neg	2,19E+05	8,96E+05	6,08E+05	9,44E-04	5,07E-03
8	Itaconic acid_neg	3,58E+06	7,59E+06	5,46E+06	2,43E-03	9,27E-03
9	N-acetylputrescine_pos	4,06E+05	3,93E+06	1,62E+06	1,04E-02	2,24E-03
10	Cysteine-S-sulfate_pos	1,46E+05	1,95E+05	3,84E+05	1,05E-02	1,48E-02
11	N-acetyl-glucosamine_pos	4,67E+05	7,19E+05	9,69E+05	1,02E-02	1,66E-02
12	Flavone_pos	1,71E+06	2,07E+06	2,72E+06	3,16E-02	7,94E-03
13	Malonic acid_neg	0,00E+00	5,93E+06	2,78E+06	2,24E-02	2,11E-02
14	2,3-dihydroxybenzoic acid_neg	1,95E+06	3,18E+06	5,19E+06	2,41E-02	1,26E-02
15	Alpha-ketoisovaleric acid_neg	2,25E+05	4,76E+05	4,35E+05	3,34E-03	3,90E-03
16	Hippuric acid_neg	2,20E+06	6,99E+06	3,92E+06	1,53E-02	2,43E-03
17	L-Acetylcarnitine_pos	3,51E+05	4,73E+06	2,80E+06	2,31E-03	1,49E-02
18	Orotic acid_neg	3,69E+06	5,16E+06	6,03E+06	1,02E-02	9,55E-03
19	1-Methylhistidine_pos	5,45E+06	7,99E+06	1,15E+07	2,27E-02	2,26E-02
20	Citramalic acid_neg	1,22E+06	2,74E+06	3,35E+06	6,95E-03	1,90E-03
21	7-methylguanine_pos	5,30E+06	2,30E+07	5,55E+07	3,29E-02	3,28E-02
22	Homogentisic acid_neg	2,66E+06	4,09E+06	5,94E+06	4,62E-02	3,67E-02
23	Histidinol_pos	1,70E+05	2,87E+05	7,13E+05	1,67E-02	2,91E-02
24	N-acetyl-L-alanine_pos	1,10E+06	2,23E+06	2,01E+06	6,47E-04	1,00E-02
25	1-Methyladenine_pos	1,21E+06	2,66E+06	5,74E+06	4,98E-02	4,26E-02
26	Hydroxyproline_pos	4,44E+05	1,21E+06	9,31E+05	1,45E-02	5,43E-03
27	Epinephrine_pos	8,39E+05	1,11E+06	2,29E+06	1,99E-02	3,50E-02
28	p-Hydroxyphenylacetic acid_neg	1,69E+06	6,18E+06	4,37E+06	2,62E-02	3,61E-02
29	beta-Alanine_pos	7,85E+05	1,54E+06	1,35E+06	2,22E-02	1,70E-02
30	Ketoleucine_neg	4,63E+06	9,12E+06	6,51E+06	3,10E-02	1,53E-02
31	Anandamide_pos	9,58E+04	1,25E+05	2,06E+05	4,06E-02	4,39E-02
32	Cortisol_pos	1,39E+06	1,59E+06	2,06E+06	1,56E-02	4,61E-02
33	a-ketoglutarate_neg	1,28E+06	2,05E+06	2,26E+06	6,63E-03	6,16E-03
34	Tiglylglycine_neg	1,36E+06	1,96E+06	2,08E+06	7,56E-03	1,59E-02
35	Creatinine_pos	4,31E+06	7,91E+06	9,06E+06	7,06E-03	3,55E-02
36	Serotonin_pos	9,39E+05	1,71E+06	1,80E+06	1,95E-03	9,88E-03
37	Cystine_pos (principal)	2,18E+05	3,21E+05	3,65E+05	6,45E-03	3,56E-02
38	Creatine_pos	1,02E+06	2,11E+06	2,20E+06	6,60E-03	1,74E-02
39	Acadesine_pos	3,03E+05	6,71E+05	6,58E+05	3,24E-03	1,76E-02
40	Nicotinamide Riboside_pos	5,00E+05	6,19E+05	6,12E+05	3,12E-02	2,28E-02
41	3-hydroxybutyrate_neg	0,00E+00	1,22E+06	1,25E+06	2,64E-02	8,91E-03
42	2-Methylcitric acid_neg	8,47E+05	2,09E+06	2,08E+06	6,65E-03	2,66E-02
43	2-Ketohexanoic acid_neg	9,25E+05	2,41E+06	2,55E+06	2,22E-02	3,20E-03

* $p < 0.05$, содержание метаболита в культуре выше, чем в исходной среде;
M-среднее значение измерений.

Уникальные метаболиты *B. toyonensis* B-13249

№	Sample Name	Medium (M)	<i>B. toyonensis</i> B-13249 (M)	Medium vs <i>B. toyonensis</i> B-13249*
1	Guanidoacetic acid_neg	1,49E+06	1,45E+07	1,14E-04
2	L-Lactic acid_neg	4,61E+07	1,34E+08	4,15E-03
3	PG(32:2)_neg	5,07E+05	6,35E+05	4,68E-02
4	Aminoadipic acid_neg	2,26E+06	6,33E+06	2,87E-03
5	Gluconolactone_neg	2,49E+06	6,36E+07	6,32E-03
6	PG(34:1)_neg	6,80E+05	1,21E+06	5,98E-03
7	N-acetylserine_neg	5,54E+06	3,02E+07	1,09E-02
8	Cysteine_pos	1,57E+05	3,36E+05	8,78E-03
9	O-acetylserine_pos	2,62E+06	1,43E+07	2,10E-02
10	PG(34:2)_neg	8,81E+05	2,73E+06	1,21E-02
11	L-Serine_pos	9,50E+06	1,81E+07	4,13E-02
12	Phenyllactic acid_neg	3,40E+07	7,39E+07	4,87E-02
13	Citraconic acid_neg	4,85E+06	1,01E+07	3,90E-03
14	L-Methionine_pos	7,33E+05	2,20E+06	2,85E-02
15	p-Aminohippuric acid_neg	3,62E+06	5,33E+06	2,10E-02
16	N-Acetylglutamic acid_neg	7,91E+05	1,39E+06	8,06E-04
17	Threonine_pos	1,29E+07	2,10E+07	3,59E-02
18	2-Isopropylmalic acid_neg	2,44E+06	1,16E+07	1,96E-02
19	Phenylpropionic acid_neg	3,25E+06	5,25E+06	3,04E-02
20	2-Keto-L-gluconate_neg	3,39E+05	8,42E+07	3,32E-02
21	Indole-3-carboxylic acid_neg	3,59E+06	1,92E+07	8,98E-03
22	Acetylcholine_pos	5,69E+06	8,66E+06	1,83E-02
23	Acetyllysine_pos	7,34E+06	1,20E+07	3,51E-02
24	Agmatine_pos	1,65E+06	2,62E+06	2,22E-02
25	1-Methylnicotinamide_pos	1,73E+07	5,35E+07	7,08E-03
26	Anthranilate_neg	1,15E+06	4,35E+06	1,89E-02
27	Oxaloacetic acid_neg	1,67E+06	3,14E+06	2,18E-02
28	Indole_pos	2,30E+06	2,67E+06	4,63E-02
29	N-carbamoyl-L-aspartate_neg	2,27E+05	4,45E+05	4,67E-02
30	DL-2-Aminooctanoic acid_pos	3,91E+05	7,48E+05	2,03E-02
31	Ethanolamine_pos	6,50E+05	8,80E+05	4,14E-02
32	Purine_pos	2,37E+06	2,64E+06	3,69E-02
33	N-Acetylornithine_pos	5,55E+05	8,65E+05	1,08E-02
34	1-Pyrroline-5-carboxylic acid_pos	1,00E+06	2,40E+06	2,05E-02
35	Pyridoxal_pos	3,81E+06	5,69E+06	1,85E-03
36	aminoimidazole carboxamide ribonucleotide_pos	9,18E+05	1,19E+06	1,11E-02
37	Xanthine_neg	2,15E+06	5,20E+06	4,69E-02

* $p < 0.05$, содержание метаболита в культуре выше, чем в исходной среде;
M-среднее значение измерений.

Уникальные метаболиты *B. pumilus* B-13250

№	Sample Name	Medium (M)	<i>B. pumilus</i> B-13250 (M)	Medium vs <i>B. pumilus</i> B-13250*
1	Pantothenic acid_neg	1,22E+06	2,73E+07	4,19E-03
2	Glucosamine_pos	3,64E+06	9,80E+07	7,35E-05
3	Docosahexaenoic acid_neg	1,63E+06	2,74E+06	1,35E-02
4	Norepinephrine_pos	4,15E+05	1,10E+06	6,18E-03
5	homocysteic acid_neg	2,97E+05	5,11E+05	1,78E-02
6	Guanosine triphosphate_neg	0,00E+00	8,40E+05	1,05E-02
7	Carnosine_pos	1,22E+06	2,87E+06	3,30E-02
8	Melatonin_pos	5,52E+05	1,43E+06	3,04E-04
9	Spermine_pos	6,64E+05	1,06E+06	2,66E-02
10	Normetanephine_pos	9,44E+06	2,85E+07	1,14E-02
11	Riboflavin_pos	2,61E+05	3,46E+06	2,43E-02
12	Isovalerylcarnitine_pos	5,46E+05	1,13E+07	2,10E-02
13	Thiamine_pos	2,38E+05	7,19E+05	1,80E-02
14	PC(16:0/18:2)_pos	0,00E+00	3,34E+04	2,30E-02
15	3-methylphenylacetic acid_neg	0,00E+00	2,15E+06	1,64E-02
16	Adipoylcarnitine_pos	3,77E+05	1,10E+06	5,76E-03
17	S-ribosyl-L-homocysteine_pos	9,75E+04	2,87E+05	8,21E-03
18	Trimethylamine-N-oxide_pos	0,00E+00	3,96E+06	2,57E-02
19	Butyrylcarnitine_pos	3,45E+05	1,78E+07	2,91E-02
20	Hypotaurine_pos	5,86E+05	2,34E+06	3,95E-02
21	3-Hydroxyisovaleryl carnitine_pos	4,99E+05	7,38E+05	2,01E-02
22	Pimelylcarnitine_pos	2,56E+05	3,97E+05	2,75E-03
23	Malonylcarnitine_pos	6,30E+05	1,33E+06	4,28E-02
24	24,25-Dihydrolanosterol_pos	2,04E+06	3,17E+06	3,68E-02
25	Mevalonic acid_neg	1,12E+06	1,74E+06	3,83E-02
26	PGF2alpha_neg	1,30E+06	1,83E+06	5,04E-03
27	3-Hydroxylinoleylcarnitine_pos	3,40E+05	7,67E+05	4,20E-02
28	3-Hydroxyhexanoylcarnitine_pos	4,82E+05	6,62E+05	4,65E-02
29	Testosterone_pos	5,18E+05	7,06E+05	4,88E-02
30	Neopterin_pos	4,60E+05	1,08E+06	2,54E-02
31	L-Kynurenine_pos	3,23E+05	6,13E+05	4,78E-02
32	arginosuccinic acid_pos	7,09E+05	1,19E+06	3,81E-02
33	Salicyluric acid_neg	3,81E+06	5,03E+06	1,21E-02
34	Acetoacetic acid_neg	3,03E+05	4,90E+05	1,55E-02
35	Homovanillic acid_neg	6,11E+05	1,42E+06	4,82E-02
36	2-Ketobutyric acid_neg	3,68E+05	5,06E+05	7,83E-03
37	Suberylcarnitine_pos	2,24E+06	4,54E+06	1,76E-02

* $p < 0.05$, содержание метаболита в культуре выше, чем в исходной среде;
М-среднее значение измерений.

Технические условия

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

(ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»)

ОКПД2 10.92.10.300

ОКС 07.100.30

ОКС 65.120

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»

С.Н. Бочаров

2022 г.

Кормовая добавка «Аквабациллин (Aquabacillin)»

для аквакультуры и животных

Технические условия

ТУ 10.92.10-001-02067818-2022


Вводятся впервые

Дата введения в действия – 06.04.2022

РАЗРАБОТАНО

ИЦ «Промбиотех», ФГБОУ ВО
«Алтайский государственный университет»

И.о. замдиректора, м.н.с.

 Евдокимов И.Ю.

В.н.с., к.б.н.

 Иркитова А.Н.

М.н.с

 Малкова А.В.

М.н.с.

 Ширманов М.В.

Лаборант-исследователь

 Дудник Д.Е.

Барнаул

2022

Приказ о введении технологической инструкции



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Алтайский государственный университет»

П Р И К А З

29.04.2022

№589/п

ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ
ИНСТРУКЦИИ

В связи с производственной необходимостью

П Р И К А З Ы В А Ю:

Утвердить прилагаемую технологическую инструкцию по производству опытно-промышленных партий пробиотика для аквакультуры в лиофилизированной форме.

Ректор

С.Н. Бочаров

Проректор по НИР

Начальник УПО

А.Н. Дунец

В.В. Назаров

Технологическая инструкция

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 574/577



УТВЕРЖДАЮ

Ректор

С.Н. Бочаров

2022 г.

Технологическая инструкция по производству опытно-промышленных партий пробиотика для
аквакультуры в лиофилизированной форме

РАЗРАБОТАНО:

и.о. замдиректора ИЦ «Промбиотех»
Евдокимов И.Ю.

Барнаул
2022

Декларация о соответствии продукции

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ
ДЕКЛАРАЦИЯ О СООТВЕТСТВИИ

№ РОСС RU Д-RU.PA01.B.30662/22



ЗАЯВИТЕЛЬ: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", ФГБОУ ВО "АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", АЛТГУ, АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, место нахождения 656049, РОССИЯ, КРАЙ АЛТАЙСКИЙ, Г. БАРНАУЛ, ПР-КТ ЛЕНИНА, Д.61, ОГРН 1022201770106, ИНН 2225004738, телефон +7 3852291291, электронная почта rector@asu.ru
В ЛИЦЕ: РЕКТОР, БОЧАРОВ СЕРГЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

ЗАЯВЛЯЕТ, ЧТО ПРОДУКЦИЯ Кормовая добавка "АКВАБАЦИЛЛИН (AQUABACILLIN)" для Аквакультуры и животных., Кормовая добавка "АКВАБАЦИЛЛИН (AQUABACILLIN)" для Аквакультуры и животных., иная информация о продукции: Сведения о дате изготовления отобранных образцов, прошедших испытания: Кормовая добавка "АКВАБАЦИЛЛИН (AQUABACILLIN)" для Аквакультуры и животных, дата изготовления - 04.05.2022., ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", ФГБОУ ВО "АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", АЛТГУ, АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, 656049, РОССИЯ, КРАЙ АЛТАЙСКИЙ, Г. БАРНАУЛ, ПР-КТ ЛЕНИНА, Д.61, адрес места осуществления деятельности: 656049, РОССИЯ, Алтайский край, г Барнаул, ул Димитрова, дом 66, ОГРН 1022201770106, ИНН 2225004738, Единые ветеринарные (ветеринарно-санитарные) требования, предъявляемые к товарам, подлежащим ветеринарному контролю (надзору), Серийный выпуск,

код ОКПД 2: 10.92.1

код ТН ВЭД ЕАЭС: 230990

СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ: Единые ветеринарные (ветеринарно-санитарные) требования, предъявляемые к товарам, подлежащим ветеринарному контролю (надзору);

СХЕМА ДЕКЛАРИРОВАНИЯ СООТВЕТСТВИЯ 2д

ДЕКЛАРАЦИЯ О СООТВЕТСТВИИ ПРИНЯТА НА ОСНОВАНИИ № П 5626 выдан 08.06.2022 испытательной лабораторией "Федеральное бюджетное учреждение "Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Новосибирской области"" RA.RU.21AЯ49;

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ: Продукт хранят в сухих, чистых и хорошо вентилируемых помещениях при температуре от 0°C до плюс 25°C.

СРОК ДЕЙСТВИЯ ДЕКЛАРАЦИИ О СООТВЕТСТВИИ с 30.08.2022 по 29.08.2027



М.П.

Заявитель

подпись

БОЧАРОВ СЕРГЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

фамилия, имя, отчество
(последнее при наличии)

ЗАЯВЛЕНИЕ: продукция безопасна при ее использовании согласно указанному способу применения в соответствии с целевым назначением. Заявителем приняты меры по обеспечению соответствия продукции требованиям, установленным техническим регламентом (техническими регламентами) Российской Федерации.

Патент на полученный биопрепарат

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2799554

**Новый пробиотический препарат на основе
консорциума спорообразующих бактерий для
аквакультуры и животных и способ его получения**

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Алтайский государственный университет" (RU)*

Авторы: *Евдокимов Иван Юрьевич (RU), Ширманов Максим
Вячеславович (RU), Малкова Ангелина Владимировна (RU),
Ирkitова Алена Николаевна (RU), Дудник Дина Евгеньевна
(RU), Дементьев Дмитрий Викторович (RU)*

Заявка № 2022108049

Приоритет изобретения **25 марта 2022 г.**Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **06 июля 2023 г.**Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **25 марта 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов