

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.852.11-579.62
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-105-113>

Поступила в редакцию 19.11.2021
Received 19.11.2021

Н. В. Сверчкова, Э. И. Коломиец

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

КРИТЕРИИ ОТБОРА И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* – ОСНОВЫ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И КОРМОВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

Аннотация. Проведен скрининг штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, выделенных из различных природных источников. Отобраны наиболее активные бактерии-антагонисты. Изучены пробиотические свойства отобранных штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus*: спектр антимикробного действия, безопасность для макроорганизма, выживаемость при пассировании через желудочно-кишечный тракт (резистентность к кислоте и желчи), отсутствие ингибирующего действия на кишечную микрофлору, естественная резистентность неплазмидной природы к широко применяемым антимикробным препаратам. Показана перспективность использования наиболее активных культур в качестве основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, птиц и рыб.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, антагонистическая активность, пробиотики, адгезия, желчь, нормофлора, устойчивость/чувствительность к антибиотикам

Для цитирования: Сверчкова, Н. В. Критерии отбора и характеристика штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* – основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для животноводства / Н. В. Сверчкова, Э. И. Коломиец // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 105–113. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-105-113>

Natalia V. Sverchkova, Emilia I. Kolomiets

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

SELECTION CRITERIA AND CHARACTERIZATION OF SPORULATING BACTERIAL STRAINS OF GENUS *BACILLUS* – THE BASIS OF PROBIOTIC PREPARATIONS AND FEED ADDITIVES FOR LIVESTOCK

Abstract. Screening of sporulating bacterial strains of genus *Bacillus* isolated from various natural sources was carried out. The most active antagonistic bacteria were chosen. Probiotic properties of the selected spore-farming *Bacillus* were investigated: spectrum of antimicrobial action, safety for macroorganism, survival in transit via gastrointestinal tract (bile and acid resistance), lack of inhibiting effect on gut microbiota, native non-plasmid resistance to widely applied antimicrobial agents. The prospects of using the most active cultures as key components of probiotics and feed additives for farm stock, poultry and fish were demonstrated.

Keywords: bacteria of genus *Bacillus*, antagonistic activity, probiotics, adhesion, bile, normal flora, antibiotic resistance/sensitivity

For citation: Sverchkova N. V., Kolomiets E. I. Selection criteria and characterization of sporulating bacterial strains of genus *Bacillus* – the basis of probiotic preparations and feed additives for livestock. *Vesti Natsyyanal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 105–113 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-105-113>

Введение. Среди микроорганизмов, используемых в составе пробиотиков для ветеринарии и кормопроизводства, известны представители родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus*. Критерии включения культур в группу пробиотиков: высокие антагонистическая активность к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и скорость роста, устойчивость к кислоте и желчи, отсутствие ингибирующего влияния на нормальную микрофлору и признаков патогенности в отношении макроорганизма даже при введении в больших дозах [1–4]. Указанным критериям в полной мере соответствуют не только представители нормофлоры – молочнокис-

лые и бифидобактерии, но и бактерии рода *Bacillus*, относящиеся к группе строго аэробных или факультативно анаэробных грамположительных микроорганизмов, образующих термоустойчивые эндоспоры. Бактерии рода *Bacillus* не являются постоянным физиологическим компонентом микробиоценоза желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных и человека и относятся к транзитной (самоэлиминирующейся) микрофлоре. В отличие от лакто- и бифидобактерий, механизм действия которых основан на кооперации нормофлоры с организмом хозяина, они не колонизируют слизистую оболочку ЖКТ и через 3–5 сут после прекращения приема препаратов элиминируются из организма. При различных острых и хронических заболеваниях ЖКТ терапевтическое действие в одних случаях может достигаться преимущественно за счет антагонистических свойств бацилл, в других – за счет продукции ими ферментов, в третьих – за счет активации защитных реакций. Но, как правило, высокая эффективность бацилл при лечении инфекционных заболеваний обусловлена комплексом взаимодополняющих свойств этих микроорганизмов, которые являются определяющими при выборе основы эффективного пробиотического препарата [5–8].

Цель настоящей работы – изучение пробиотических свойств отобранных из природных источников высокоактивных штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus* и перспектив их использования в качестве основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, птиц и рыб.

Объекты и методы исследования. Основными объектами исследования служили штаммы бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-454, *Bacillus velezensis* БИМ В-497, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-713 с высокой ферментативной и антагонистической активностью к бактериальным патогенам животных и птиц, выделенные нами из почвы и стоков животноводческих комплексов, птицефабрик, а также штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-844, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-845, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1125 – антагонисты бактериальных патогенов рыб, выделенные из речного ила и прибрежной почвы.

В качестве тест-объектов для определения антагонистической активности исследуемых культур использовали условно-патогенные бактерии родов *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pasterella*, *Salmonella* – возбудители инфекционных заболеваний ЖКТ и органов дыхательной системы животных и птиц, а также бактерии родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* – возбудители бактериальных болезней рыб, любезно предоставленные РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им С. Н. Вышелеского» и РУП «Институт рыбного хозяйства».

Глубинное культивирование бактерий-антагонистов осуществляли на питательной среде Мейнелла с мелассой в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при температуре 28–30 °С в течение 48 ч и в 10-литровых лабораторных ферментерах АНКУМ-10М (скорость перемешивания 200 ± 10 об/мин, температура 30 ± 2 °С, интенсивность аэрации 0,5–2,0 л воздуха/л·мин). Для засева питательной среды использовали 1–2-суточный вегетативный посевной материал в количестве 10 % об. Выращивание посевного материала спорообразующих бактерий проводили на мясо-пептонном бульоне (МПБ), выращивание тест-объектов – на МПБ в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при температуре 28–30 °С в течение 24 ч.

Анализ антимикробной активности отобранных бактерий-антагонистов осуществляли методом лунок [9]. Для определения титра (КОЕ и спор) бактерий использовали метод предельных разведений [10]. Титр спор определяли после предварительной термической обработки (10 мин при температуре 80 ± 2 °С). Процесс спорообразования бактерий-антагонистов контролировали путем микроскопирования проб культуральной жидкости (КЖ).

Определение адгезивных свойств бацилл осуществляли по методике В. И. Брилиса и Х. П. Ленцнера [11], используя в качестве модели стабилизированные глютаровым альдегидом эритроциты барана и человека.

Устойчивость бацилл к кислоте и желчи изучали в модельных опытах *in vitro* [12]. Клетки 48-часовой культуры бацилл, выращенной в среде Мейнелла, прогревали 15 мин при температуре 80 °С на водяной бане. Полученную суспензию спор осаждали путем центрифугирования (2500 об/мин, 10 мин), дважды отмывали и ресуспензировали в фосфатно-солевом буфере. Затем споровую

суспензию бацилл в количестве 0,5 мл добавляли к 4,5 мл искусственного желудочного сока (NaCl – 0,5 %, пепсин – 0,3 %, HCl до pH 2,0) и инкубировали на водяной бане при температуре 37 °С в течение 3 ч. Для проверки устойчивости бацилл к условиям кишечника споровую суспензию бацилл добавляли к искусственному кишечному соку (смешанный питательный бульон, желчь – 0,3 %, панкреатин – 0,1 %, pH 8,0) и культивировали на качалке (250 об/мин, 37 °С) 6 ч. Устойчивость клеток бацилл к желчи изучали на агаризованном мясо-пептонном бульоне с добавлением желчи в концентрациях 0,3; 0,5; 1; 5 и 10 %. Изучали также способность к росту бацилл при различных значениях pH (от 2,0 до 10,0). В работе использовали пепсин, желчь и панкреатин производства Sigma (США).

Чувствительность исследуемых бактерий рода *Bacillus* к антибиотикам (мкг/мл) определяли методом серийных разведений антибиотика в агаризованной среде [13].

При статистической обработке результатов экспериментов [14] определяли средние арифметические и их доверительные интервалы для уровня вероятности 95 % с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. На основе проведенного скрининга из более чем 2000 изолятов, выделенных из различных природных источников, отобрано 132 изолята с антимикробной активностью к бактериям *Escherichia coli* S-3, *Staphylococcus* sp. 7 – патогенам животных и птиц и 32 изолята с антагонистической активностью к возбудителям бактериальных болезней рыб *Aeromonas* sp. 56 и *Ps. putrefaciens* 62.

Максимальную антимикробную активность к испытанным бактериальным патогенам *Escherichia coli* S-3, *Staphylococcus* sp. 7 проявляли изоляты 9/9, I 22, Кл 53, у которых диаметр зоны ингибирования роста тест-объектов составлял 25,0–27,0 и 29,0–32,0 мм соответственно.

Среди 32 культур с антагонистической активностью к возбудителям бактериальных болезней рыб (*Aeromonas* sp. 56 и *Pseudomonas putrefaciens* 62) для дальнейшей работы отобрано три изолята – 2, 54, 355 (диаметр зоны подавления роста *Aeromonas* sp. и *Pseudomonas putrefaciens* составлял 26,5–32,0 и 30,0–32,5 мм соответственно).

С использованием микробиологических, молекулярно-генетических методов проведена их идентификация. Штаммы микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней сельскохозяйственных животных и птиц идентифицированы как *Bacillus amyloliquefaciens* 9/9, *Bacillus amyloliquefaciens* Кл 53, *Bacillus velezensis* I 22; штаммы микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней рыб идентифицированы как *Bacillus amyloliquefaciens* 2, *Bacillus amyloliquefaciens* 54 и *Bacillus amyloliquefaciens* 355.

По данным токсикологической проверки, проведенной сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», отобранные штаммы не являются патогенными и токсигенными и могут использоваться в микробиологическом производстве. Культуры депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. velezensis* БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-845, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1125.

При изучении спектра антагонистической активности отобранных штаммов (табл. 1) установлено, что все культуры обладают высокой антимикробной активностью к испытанным патогенам, причем бактерии *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *B. velezensis* БИМ В-497 проявляют более выраженное антагонистическое действие к возбудителям болезней сельскохозяйственных животных и птиц – бактериям родов *Escherichia*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus* (диаметр зоны задержки роста тест-культур находится в диапазоне 19,0–33,5 мм), а *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-845, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1125 – к патогенной и условно-патогенной микробиоте рыб (диаметр зоны задержки роста тест-объектов – 24,0–34,0 мм).

При сравнительном анализе антагонистической активности исследуемых штаммов бактерий с известными антагонистами рода *Bacillus*, в частности *B. subtilis* ВКМ В-4759Д (основа пробиотика Субалин, Россия) [15], *B. licheniformis* и *B. subtilis* (основа пробиотика Субтилис, Россия) [16], *B. licheniformis* DSM 5749 и *B. subtilis* DSM 5750 (основа пробиотика БиоПлюс2Б, Германия) [17], *B. cereus* var. *toyoi* (Тойоцерин, Германия) [18], установлено, что исследуемые культуры по

Таблица 1. Сравнительная оценка спектра антимикробного действия отобранных бактерий-антагонистов рода *Bacillus* (метод лунок) в отношении возбудителей болезней сельскохозяйственных животных, птиц и рыбTable 1. Comparative evaluation of spectrum of antimicrobial action of the selected antagonistic bacteria of genus *Bacillus* (estimated by wells technique) in regard to pathogens of farm stock, poultry and fish

Тест-объект	Вызываемое заболевание	Диаметр зоны задержки роста тест-объекта, мм						
		<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-454	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-713	<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-1125	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-844	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-845	
Бактериальные патогены сельскохозяйственных животных								
<i>Escherichia coli</i> 099	Заболевания ЖКТ	25,0 ± 0,3	25,5 ± 0,2	26,5 ± 0,1	22,0 ± 0,3	21,0 ± 0,2	22,5 ± 0,1	
<i>E. coli</i> 018		21,0 ± 0,2	22,5 ± 0,1	23,5 ± 0,2	19,0 ± 0,2	20,5 ± 0,1	18,5 ± 0,3	
<i>E. coli</i> S-3		22,0 ± 0,2	23,5 ± 0,2	24,5 ± 0,3	18,0 ± 0,3	19,5 ± 0,2	20,5 ± 0,3	
<i>E. coli</i> A-20		21,0 ± 0,2	24,0 ± 0,3	23,5 ± 0,3	20,0 ± 0,2	20,0 ± 0,3	21,5 ± 0,3	
<i>Pasterella multacida</i> V2		22,0 ± 0,3	25,0 ± 0,2	21,0 ± 0,1	19,0 ± 0,2	21,0 ± 0,1	18,0 ± 0,2	
<i>Proteus vulgaris</i> 3		24,0 ± 0,3	23,0 ± 0,3	22,0 ± 0,3	20,0 ± 0,3	19,0 ± 0,2	18,0 ± 0,1	
<i>Salmonella dublin</i> V1		19,0 ± 0,2	18,5 ± 0,3	19,0 ± 0,3	15,0 ± 0,2	16,5 ± 0,3	16,0 ± 0,2	
<i>Salmonella holeraesuis</i> 2		21,2 ± 0,2	19,0 ± 0,2	19,0 ± 0,1	19,0 ± 0,1	18,0 ± 0,2	15,0 ± 0,1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 9		Заболевания органов дыхательной системы	21,0 ± 0,2	18,5 ± 0,2	12,0 ± 0,1	18,0 ± 0,2	16,5 ± 0,3	13,0 ± 0,2
<i>Staphylococcus</i> sp. 7			29,0 ± 0,3	32,0 ± 0,4	31,0 ± 0,3	25,0 ± 0,2	27,0 ± 0,3	28,0 ± 0,2
<i>Streptococcus</i> sp. H-2	28,5 ± 0,2		29,0 ± 0,2	30,0 ± 0,1	25,5 ± 0,2	26,0 ± 0,2	28,0 ± 0,3	
Бактериальные патогены птиц								
<i>E. coli</i> K-3	Заболевания ЖКТ	21,0 ± 0,2	26,0 ± 0,4	24,0 ± 0,2	19,0 ± 0,1	22,0 ± 0,3	20,0 ± 0,3	
<i>E. coli</i> 39A		25,0 ± 0,7	24,0 ± 0,2	20,0 ± 0,5	22,0 ± 0,4	23,0 ± 0,3	18,0 ± 0,2	
<i>Salmonella</i> sp. 3		22,0 ± 0,4	19,0 ± 0,2	20,5 ± 0,3	20,0 ± 0,2	16,0 ± 0,1	19,5 ± 0,3	
<i>Staphylococcus</i> sp. 1	Заболевания органов дыхательной системы	33,5 ± 0,3	29,5 ± 0,2	31,5 ± 0,4	29,5 ± 0,3	25,5 ± 0,2	28,5 ± 0,2	
Бактериальные патогены рыб								
<i>Aeromonas</i> sp. 40	Бактериальная геморрагическая септицемия (аэромоноз)	21,5 ± 0,2	24,0 ± 0,1	25,5 ± 0,2	26,0 ± 0,3	25,0 ± 0,3	27,0 ± 0,7	
<i>Aeromonas</i> sp. 54		22,0 ± 0,1	23,0 ± 0,2	23,5 ± 0,2	30,0 ± 0,2	28,0 ± 0,4	29,0 ± 0,4	
<i>Aeromonas</i> sp. 56		23,0 ± 0,3	22,5 ± 0,1	23,0 ± 0,3	30,0 ± 0,2	31,0 ± 0,4	32,0 ± 0,5	
<i>Aeromonas hydrophila</i> 63		24,5 ± 0,3	25,0 ± 0,2	23,5 ± 0,4	29,5 ± 0,3	27,5 ± 0,6	28,0 ± 0,3	
<i>A. hydrophila</i> gr.1		25,0 ± 0,2	24,5 ± 0,1	24,0 ± 0,2	31,0 ± 0,2	25,0 ± 0,3	26,5 ± 0,6	
<i>Aeromonas hydrophila</i> gr.2		25,0 ± 0,2	25,0 ± 0,2	23,5 ± 0,2	29,0 ± 0,3	25,5 ± 0,4	27,0 ± 0,7	
<i>Aeromonas sobria</i> 61		22,0 ± 0,3	23,0 ± 0,2	22,5 ± 0,1	25,0 ± 0,1	26,0 ± 0,3	24,0 ± 0,2	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Поражения кожи, слизистых оболочек	13,0 ± 0,1	15,0 ± 0,2	12,0 ± 0,1	20,5 ± 0,2	18,5 ± 0,2	17,0 ± 0,3	
<i>Shewanella putrefaciens</i> 62		22,0 ± 0,4	21,0 ± 0,2	22,0 ± 0,3	26,0 ± 0,1	22,5 ± 0,3	23,5 ± 0,4	
<i>Sphingobacterium multivorum</i> 60		19,0 ± 0,3	20,0 ± 0,3	20,5 ± 0,3	29,0 ± 0,3	34,0 ± 0,6	28,0 ± 0,5	

антагонистической активности не уступают зарубежным аналогам, а в отношении некоторых тест-объектов (*Pasterella multacida*, *Proteus vulgaris* и др.) превосходят их, что свидетельствует о перспективности использования отобранных культур в биологическом контроле патогенов животных.

В соответствии с требованиями, предъявляемыми к пробиотическим микроорганизмам, штаммы бактерий, не являющиеся представителями нормальной микрофлоры, должны проходить транзитом через желудок и тонкий кишечник, а представители нормофлоры должны адгезироваться на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией. В отношении спорообразующих бактерий большинство авторов отмечают их слабые адгезивные свойства [19]. Активность бацилл осуществляется в просвете кишечника и связана прежде всего не с конкурентными взаимоотношениями за места прикрепления к слизистой, а с высокой антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов [20–22]. Проведенные нами исследования подтвердили эти данные. Так, индекс адгезивности у отобранных штаммов бактерий рода *Bacillus*, установленный по методике В. И. Брилиса и Х. П. Ленцера [11] с использованием

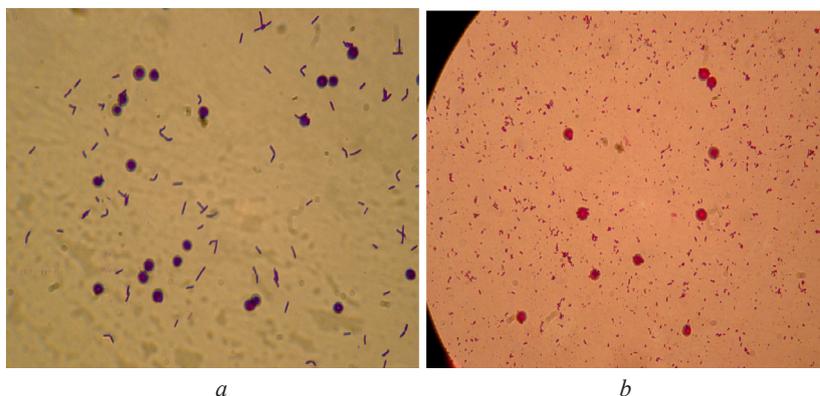
в качестве модели стабилизированных глютаровым альдегидом эритроцитов барана и человека, составляет менее 1 (табл. 2), тогда как у высокоадгезивных штаммов лактобацилл и бифидобактерий – около 4. Приведенные показатели свидетельствуют о способности спорообразующих бактерий колонизировать слизистую оболочку ЖКТ животных непродолжительное время и подтверждают принадлежность исследованных штаммов к экзогенной транзитной (самоэлиминирующейся) микрофлоре.

Таблица 2. Индекс адгезивности отобранных штаммов бактерий рода *Bacillus*

Table 2. Adhesion index of the selected bacterial strains of genus *Bacillus*

Штамм	Индекс адгезивности микроорганизмов	
	с эритроцитами барана	с эритроцитами человека
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-454	0,85	0,90
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-713	0,93	0,85
<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	0,95	0,95
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1125	0,94	0,99
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-844	0,95	0,99
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-845	0,75	0,70
<i>E. coli</i> (контроль)	1,95	1,8

Полученные результаты подтверждены и методом микроскопирования (см. рисунок). У штамма *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454 с низким уровнем адгезивности отмечены единичные случаи сорбции клеток, тогда как у контрольного штамма *E. coli* уровень адгезивной активности значительно выше.



Адгезивные свойства штаммов: а – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454; б – *E. coli* (контроль)

Adhesive properties of strains: a – *B. amyloliquefaciens* BIM В-454; b – *E. coli* (control)

Изучено влияние отобранных штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* на представителей нормофлоры ЖКТ сельскохозяйственных животных и птиц – бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Установлено, что зоны подавления роста испытанных штаммов молочнокислых и бифидобактерий (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*) под действием исследуемых бациллярных культур отсутствуют.

При прохождении бациллярных культур через ЖКТ их жизнеспособность может снижаться под действием желудочного сока и солей желчных кислот. По данным ряда авторов [22, 23], минимальным титром клеток и спор, способным осуществлять значимое действие в ЖКТ животного, является не менее 10^7 КОЕ. В этой связи представлялось необходимым исследовать устойчивость исследуемых штаммов к кислоте и желчи.

Выживаемость отобранных бактерий оценена при различных концентрациях желчи (от 0,3 до 10 %) и в широком диапазоне рН (от 2,0 до 10,0) в экспериментах на агаризованном мясо-пептонном бульоне. Все исследуемые бактерии оказались устойчивы к повышенным концентрациям

желчи (до 10 %) и сохраняли свою жизнеспособность при инкубировании в течение 6 ч в кислой (рН 2,0–5,0) и слабощелочной (рН 8,0–9,0) среде.

Для создания условий, которые придется преодолеть пробиотическим бактериям при прохождении через ЖКТ животного, споры отобранных культур бактерий инкубировали в течение 3 ч в искусственном желудочном соке, имеющем кислую реакцию среды (рН 2,0) и содержащем фермент пепсин. Результаты данного эксперимента показали, что титр спор исследуемых бактерий за указанный промежуток времени в модельных условиях желудка снижается незначительно, что обеспечивает достижение необходимой концентрации интродуцируемых бактерий (табл. 3).

В опыте, моделирующем условия тонкого кишечника (смешанный питательный бульон, желчь – 0,3 %, панкреатин – 0,1 %, рН 8,0), показано, что споры исследуемых бактерий проявляют устойчивость к желчи (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Оценка устойчивости штаммов бактерий рода *Bacillus* к стрессовым факторам

T a b l e 3. Resistance of bacterial strains of genus *Bacillus* to stress factors

Штамм	Титр, спор/мл		
	исходной КЖ	после инкубации в модельных условиях желудка	после инкубации в модельных условиях кишечника
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-454	2,3·10 ⁹	6,2·10 ⁸	2,5·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-713	1,3·10 ⁹	7,2·10 ⁸	2,2·10 ⁹
<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	2,1·10 ⁹	7,3·10 ⁸	3,1·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1125	1,2·10 ⁹	6,4·10 ⁸	3,3·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-844	2,3·10 ⁹	8,3·10 ⁸	2,2·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-845	2,2·10 ⁹	8,2·10 ⁸	1,3·10 ⁹

Таким образом, приведенные в табл. 3 данные свидетельствуют о способности штаммов бактерий-антагонистов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *B. velezensis* БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1125, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-845 выживать в различных отделах ЖКТ, проявляя высокую устойчивость к желчи, кислоте, щелочным условиям среды, что может быть связано с образованием бактериями эндоспор, которые обуславливают невосприимчивость к действию стрессовых факторов.

Современные схемы лечения животных и птиц предусматривают антибиотикотерапию с одновременным применением пробиотиков для профилактики и коррекции дисбиотических состояний ЖКТ. Поэтому желательным, чтобы пробиотические штаммы рода *Bacillus* были устойчивы к терапевтическим дозам антибиотиков, применяемых в ветеринарной практике. С другой стороны, высокая устойчивость к антибиотикам может быть обусловлена присутствием в клетках пробиотических бактерий генетических детерминант, которые могут передаваться другим микроорганизмам, в том числе патогенным и условно-патогенным. Поэтому Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA) ввело ограничения на использование в биотехнологии штаммов бактерий, устойчивость которых к «показательным» антибиотикам превышает установленные значения [22, 23].

Для изучения устойчивости/чувствительности отобранных бацилл к антибиотикам были использованы антибиотики 8 групп – пенициллинов (ампициллин), аминогликозидов (стрептомицин, гентамицин, канамицин), левомицитинов (хлорамфеникол), цефалоспоринов (цефазолин), тетрациклинов (доксциклин), макролидов (эритромицин) (табл. 4).

Показано, что исследуемые культуры проявляют устойчивость к ампициллину (300 мкг/мл), стрептомицину (20 мкг/мл), хлорамфениколу (10 мкг/мл) и чувствительны к гентамицину, канамицину, цефазолину, доксициклину, эритромицину в испытанных концентрациях. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения бактериальных препаратов во время лечения ампициллином, стрептомицином, хлорамфениколом.

Присутствие в клетках пробиотических бактерий внехромосомных генетических элементов рассматривается как нежелательное свойство, поскольку существует риск передачи резистентности

Т а б л и ц а 4. Устойчивость штаммов бактерий *B. subtilis* к антибиотическим препаратамT a b l e 4. Resistance of *B. subtilis* strains to antibiotics

Штамм	Антибиотики							
	Amp ³⁰⁰	Str ²⁰	Chl ¹⁰	Gm ⁵	Km ⁵	Cef ⁵	Dc ⁵	Ery ⁵
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-454	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-713	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1125	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-844	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-845	+	+	+	–	–	–	–	–

П р и м е ч а н и е. Используемые антибиотики (мкг/мл): Amp³⁰⁰ – ампицилин 300, Str²⁰ – стрептомицин 20, Chl¹⁰ – хлорамфеникол 10, Gm⁵ – гентамицин 5, Km⁵ – канамицин 5, Cef⁵ – цефазолин 5, Dc⁵ – доксициклин 5, Ery⁵ – эритромицин 5; «+» – устойчивые культуры, «–» – чувствительные культуры.

от пробиотических штаммов к патогенам и комменсальной микробиоте. Поэтому для производства препаратов-пробиотиков рекомендуется использовать бесплазмидные штаммы микроорганизмов. Молекулярно-генетические исследования показали, что отобранные штаммы не содержат резидентных плазмид, что подтверждает хромосомную локализацию детерминант антибиотикоустойчивости. Таким образом, при использовании выделенных штаммов в ветеринарии и кормопроизводстве не возникает опасности появления резистентности у патогенов, что обуславливает перспективность применения бактерий-антагонистов в качестве основы пробиотических препаратов.

З а к л ю ч е н и е. Исследованы биологические свойства штаммов бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. velezensis* БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-844, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-845, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1125 – антагонистов патогенов сельскохозяйственных животных, птиц и рыб. Установлено, что культуры *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. velezensis* I 22 БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713 обладают широким спектром антагонистической активности к возбудителям болезней сельскохозяйственных животных и птиц; штаммы *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-355, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1125 проявляют высокую антагонистическую активность к возбудителям болезней прудовых и ценных видов рыб. Штаммы-антагонисты не ингибируют роста представителей нормальной кишечной микробиоты; принадлежат к экзогенной транзитной (самоэлиминирующейся) микрофлоре, о чем свидетельствует индекс адгезивности менее 1; устойчивы к кислотному стрессу (рН от 2 до 10), желчи (от 0,3 до 10 %); проявляют устойчивость к ампициллину (300 мкг/мл), стрептомицину (20 мкг/мл), хлорамфениколу (10 мкг/мл); не содержат плазмид; не являются патогенными, токсигенными, аллергенными и могут использоваться в микробиологическом производстве. По совокупности исследованных признаков отобранные штаммы бактерий сравнимы или превосходят лучшие зарубежные аналоги и могут служить основой новых высокоактивных пробиотических препаратов для ветеринарии и кормопроизводства.

Список использованных источников

1. Markowiak, P. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition / P. Markowiak, K. Śliżewska // Gut Pathogens. – 2018. – Vol. 10. – Art. 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
2. Перспективы применения пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* / М. К. Койлыбаева [и др.] // Вестн. Казах. нац. мед. ун-та. – 2018. – № 4. – С. 181–184.
3. Cutting, S. M. *Bacillus* probiotics / S. M. Cutting // Food Microbiol. – 2011. – Vol. 28, N 2. – P. 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
4. Похиленко, В. Пробиотики: профессиональный взгляд и тема выбора / В. Похиленко // Ценовик. – 2016. – № 12. – С. 50–52.
5. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics / H. A. Hong [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105, N 2. – P. 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>

6. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease / B. Sánchez [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2017. – Vol. 61, N 1. – Art. 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
7. Patel, R. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics / R. Patel, H. L. DuPont // *Clin. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 60, suppl. 2. – P. 108–121. <https://doi.org/10.1093/cid/civ177>
8. Гатауллин, А. Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / А. Г. Гатауллин. – М., 2005. – 131 л.
9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М. Н. Пименова [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – 3-е изд. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
10. Методы почвенной микробиологии и биохимии : учеб. пособие / И. В. Асеева [и др.] ; под ред. Д. Г. Звягинцева. – 2-е изд. – М. : Изд-во МГУ, 1991. – 302 с.
11. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис [и др.] // *Лаб. дело.* – 1986. – № 4. – С. 210–212.
12. Коррекция нарушений микробиоценоза человека с помощью пробиотиков / М. Ю. Волков [и др.] // *Вопр. питания.* – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 32–35.
13. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии : учеб. пособие / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева ; под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Дрофа, 2004. – 256 с.
14. Тюрин, Ю. Н. Статистический анализ данных на компьютере / Ю. Н. Тюрин, А. А. Макаров. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : ИНФРА-М, 2002. – 528 с.
15. Сорокулова, И. Б. Пробиотик Субалин – принципиально новый подход к лечению бактериальных и вирусных инфекций [Электронный ресурс] / И. Б. Сорокулова. – Режим доступа: <http://subalin.com.ua>. – Дата доступа: 08.10.2021.
16. Шульга, Е. А. Лечебные свойства пробиотика Субтилис при репарации кожных покровов осетровых рыб / Е. А. Шульга, Ю. Н. Грозеску, А. А. Бахарева // *Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер. Рыб. хоз-во.* – 2009. – № 1. – С. 86–89.
17. Башкиров, О. Г. Биоплюс 2Б – современный, высокоэффективный пробиотик / О. Г. Башкиров // *Зооиндустрия.* – 2011. – № 11. – С. 5–8.
18. Желамский, С. В. Новый пробиотик Тойоцерин [Электронный ресурс] / С. В. Желамский // *Ценовик.* – 2005. – № 2. – Режим доступа: www.tsenovik.ru. – Дата доступа: 12.10.2020.
19. Плотникова, Е. Ю. Эффекты активных метаболитов *Bacillus subtilis* в пробиотическом продукте нового поколения / Е. Ю. Плотникова // *Мед. образование.* – 2018. – Т. 2, № 3. – С. 39–44.
20. Смирнов, В. В. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов / В. В. Смирнов, Н. К. Коваленко // *Микробиол. журн.* – 2002. – № 4. – С. 62–80.
21. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктисова [и др.] // *Уч. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2017. – Т. 159, № 1. – С. 85–107.
22. Савустьяненко, А. В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* / А. В. Савустьяненко // *Актуальная инфектология.* – 2016. – № 2. – С. 35–44.
23. Marshall, V. M. Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects (2005) / V. M. Marshall // *Int. J. Dairy Technol.* – 2007. – Vol. 60, N 1. – P. 63–64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00272.x>

References

1. Markowiak P., Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 2018, vol. 10, art. 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
2. Koilybaeva M. K., Ustenova G. O., Batyrbaeva D. Zh., Alibaeva Zh. S., Mustafina K. K. Application prospects of probiotics based on bacteria *Bacillus*. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of the Kazakh National Medical University], 2018, no. 4, pp. 181–184 (in Russian).
3. Cutting S. M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 2011, vol. 28, no. 2, pp. 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
4. Pokhilenko V. Probiotics: professional outlook and choice dilemma. *Tsenovik* [Price analyst], 2016, no. 12, pp. 50–52 (in Russian).
5. Hong H. A., Huang J.-M., Khaneja R., Hiep L. V., Urdaci M. C., Cutting S. M. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, vol. 105, pp. 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>
6. Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2017, vol. 61, no. 1, art. 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
7. Patel R., DuPont H. L. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, vol. 60, suppl. 2, pp. 108–121. <https://doi.org/10.1093/cid/civ177>
8. Gataullin A. G. *Biological properties of Bacillus subtilis strains promising for generation of novel probiotics*. Ph. D. diss. Moscow, 2005. 131 p. (in Russian).
9. Pimenova M. N., Grechushkina N. N., Netrusov A. I., Semenova E. V., Zakharchuk L. M., Zinchenko V. V., Kolotilova N. N., Myl'nikova S. I., Nefelova M. V., Botvinko I. V. *Directory of practical studies on microbiology. 3rd ed.* Moscow, Publishing house of Moscow University, 1995. 224 p. (in Russian).
10. Aseeva I. V., Bab'eva I. P., Byzov B. A., Guzev V. S., Dobrovol'skaya T. G., Zvyagintsev D. G. [et al.]. *Methods of soil microbiology and biochemistry. 2nd ed.* Moscow, Publishing house of Moscow University, 1991. 302 p. (in Russian).

11. Brilis V. I., Brilene T. A., Lentsner Kh. P., Lentsner A. A. Methodology of studying adhesive process in microorganisms. *Laboratornoe delo* [Laboratory practice], 1986, no. 4, pp. 210–212 (in Russian).
12. Volkov M. Yu., Sinitsa A. V., Tkachenko E. I., Uspenskii Yu. P., Tikhonov I. V. Correction of human microbiocenosis disturbances with the help of probiotics. *Voprosy pitaniya* [Aspects of nutrition], 2006, vol. 75, no. 4, pp. 32–35 (in Russian).
13. Tepper E. Z., Shil'nikova V. K., Pereverzeva G. I. *Practical studies in microbiology: a manual*. Moscow, Drofa Publ., 2004. 256 p. (in Russian).
14. Tyurin Yu., Makarov A. A. *Computer-aided statistical data analysis*. Moscow, INFRA-M Publ., 2002. 528 p. (in Russian).
15. Sorokulova I. B. *Probiotic Subalin – a radical novel approach to treatment of bacterial and viral infections*. Available at: <http://subalin.com.ua/> (accessed 08.09.2021).
16. Shul'ga E. A., Grozesku Yu. N., Bakhareva A. A. The medicinal properties of probiotic “Subtilis” at the reparation of sturgeon coverlet. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya Rybnoe khozyaistvo* [Bulletin of the Astrakhan State Technical University. Fisheries Series], 2009, no. 1, pp. 86–89 (in Russian).
17. Bashkirov O. G. BioPlus 2B – up-to-date supereffective probiotic. *Zooindustriya* [Animal husbandry], 2011, no. 11, pp. 5–8 (in Russian).
18. Zhelamskii S. V. Novel probiotic Toyocerin. *Tsenovik* [Price analyst], 2005, no. 2. Available at: <http://www.tsenovik.ru> (accessed 12.10.2021).
19. Plotnikova E. Yu. Effects of *Bacillus subtilis* active metabolites in probiotic product of novel generation. *Russkii meditsinskii zhurnal. Meditsinskoe obozrenie* [Russian medical journal. Medical review], 2018, vol. 2, no. 3, pp. 39–44 (in Russian).
20. Smirnov V. V., Kovalenko N. K. Probiotics based on living microbial cultures. *Mikrobiologicheskii zhurnal* [Microbiological journal], 2002, no. 4, pp. 62–80 (in Russian).
21. Feoktistova N. V., Mardanova A. M., Khadieva G. F., Sharipova M. R. Probiotics based on bacteria of genus *Bacillus* in poultry breeding. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki* [Scientific notes of Kazan University. Series Natural Sciences], 2017, vol. 159, no. 1, pp. 85–107 (in Russian).
22. Savust'yanenko A. V. Mechanisms of probiotics action shown by *Bacillus subtilis*. *Aktual'naya infektologiya* [Modern infectology], 2016, no. 2, pp. 35–44 (in Russian).
23. Marshall V. M. Probiotics and prebiotics: scientific aspects (2005). *International Journal of Dairy Technology*, 2007, vol. 60, no. 1, pp. 63–64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00272.x>

Информация об авторах

Сверчкова Наталья Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sverchkova@mbio.bas-net.by

Коломиец Эмилия Ивановна – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Natalia V. Sverchkova – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sverchkova@mbio.bas-net.by

Emiliya I. Kolomiets – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by