

УДК 579.64

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SP.*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ****Д.Е. Дудник**

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

Биологические препараты, как альтернатива химическим средствам, приобретают важное значение в сельском хозяйстве. В настоящее время биопрепараты нашли свое применение как в растениеводстве, так и в животноводстве. Основную их массу составляют препараты на основе различных микроорганизмов. В животноводстве микробные препараты представлены пробиотиками, кормовыми добавками и биодезинфектантами. Среди активно используемых для изготовления таких продуктов микроорганизмов уделяется большое внимание бактериям *Bacillus*, широко распространенным в природе. Род *Bacillus* обладает набором характеристик, позволяющим получать высокоактивные препараты. Кроме того, данные бактерии более удобны в культивировании, в отличие от лакто- и бифидобактерий, и стойки, за счет образования спор, к действию факторов окружающей среды [3]. Для сохранения активности микробных препаратов, и как следствие преимущества перед конкурентами на рынке, необходим постоянный поиск и отбор новых штаммов. При отборе штаммов необходимо изучить их свойства, которые обеспечат наибольшую активность препарата. К таким свойствам относятся в том числе и антагонистическая активность, и антибиотикорезистентность штамма. Антагонистическая активность штаммов бактерий, входящих в состав препарата, в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов обеспечивает снижение заболеваемости и падежа животных и птиц, а также благоприятно влияет на их рост и продуктивность [4, 5]. Также важное значение имеет исследование новых штаммов на антибиотикорезистентность. Штаммы из микробного препарата, имеющие устойчивость к действию антимикробных соединений могут передать гены устойчивости патогенным микроорганизмам [2].

Объектами исследования являлись 6 штаммов бактерии *Bacillus sp.*, 5 из которых были выделены из подстилки мест содержания животных и птиц в личных подсобных хозяйствах (*Bacillus sp.* 1, 2, 3, 4 и 5) и 1 – из пруда, находящегося вблизи мест выпаса крупного рогатого скота (*Bacillus sp.* 6). Образцы подстилки и воды из пруда были отобраны на территории Алтайского края. В качестве тест-культур были использованы штаммы *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* К-19, *S. marcescens* К-28, *Staphylococcus sp.* 1, *Staphylococcus sp.* 2, *Candida albicans* 1, *C. albicans* 2 из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ.

Антагонистическую активность выделенных штаммов определяли методом перпендикулярных штрихов на плотной L-среде (для штаммов *E. coli*, *S. marcescens* и *Staphylococcus sp.*) и YEP агаре (для штаммов *C. albicans*). Исследуемые штаммы высевали штрихом на поверхность среды и культивировали при 37°C в течении 24 часов. По окончанию роста бацилл перпендикулярно к ним подсеивали штрихи тест-культур и инкубировали еще 24 часа, после чего проводили учет результатов. Наличие антагонистической активности определяли, измеряя зону угнетения роста тест-культуры на границе с исследуемым штаммом [1]. Устойчивость новых штаммов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. В работе использовали диски с тетрациклином (30 мкг), стрептомицином (10 мкг), бензилпенициллином (10 мкг), ампициллином (10 мкг), канамицином (30 мкг), тилозином (15 мкг), левомицетином (30 мкг), неомицином (30 мкг), энрофлоксацином (5 мкг) и доксицилином (30 мкг). Чашки Петри с L-средой засеивали «газоном» исследуемого штамма *Bacillus sp.*, подсушивали и выкладывали на поверхность диски, пропитанные растворами антибиотиков. Результаты оценивали после культивирования в термостате при 37°C в течении 24 часов по величине зоны ингибирования роста исследуемого штамма вокруг диска [6].

Все штаммы *Bacillus sp.* обладали антагонистической активностью в отношении *E. coli*. Максимальная задержка роста *E. coli* наблюдалась у *Bacillus sp.* 3. Также все штаммы *Bacillus sp.* полностью подавляли рост культур *Staphylococcus sp.*, что указывает на высокую активность данных бацилл в отношении грамположительных бактерий (табл. 1). Антагонистической активностью в отношении *S. marcescens* характеризовались *Bacillus sp.* 1 и 6. Кроме того эти штаммы также проявляли антагонизм к *E. coli*, что указывает их на потенциальную активность в отношении других грамотрицательных микроорганизмов. Остальные штаммы не характеризовались угнетающим действием на *S. marcescens*.

Таблица 1 Антагонистическая активность новых штаммов *Bacillus sp.*

Тест-культура	Зона подавления роста тест-культуры, мм					
	<i>Bacillus sp</i> 1	<i>Bacillus sp</i> 2	<i>Bacillus sp</i> 3	<i>Bacillus sp</i> 4	<i>Bacillus sp</i> 5	<i>Bacillus sp</i> 6
<i>E. coli</i>	1,3±0,6	6,3±0,6	7,3±0,6	2,3±0,6	5,7±0,6	2,3±0,6
<i>S. marcescens</i> К-19	3,7±0,6	0	0	0	0	3,3±0,6
<i>S. marcescens</i> К-28	3,3±0,6	0	0	0	0	3,0±0,0
<i>Staphylococcus sp.</i> 1	OP	OP	OP	OP	OP	OP
<i>Staphylococcus sp.</i> 2	OP	OP	OP	OP	OP	OP
<i>C. albicans</i> 1	OP	OP	8,7±1,2	0	17,7±2,1	0
<i>C. albicans</i> 2	OP	OP	0	0	OP	0

OP – Отсутствие роста, штамм *Bacillus sp.* полностью блокировал рост тест-культуры на всем штрихе.

Фунгицидную активность в отношении обоих штаммов *C. albicans* проявили штаммы *Bacillus sp.* 1, 2 и 5. Для штаммов 4 и 6 антагонизм к *C. albicans* не был зафиксирован. Возможной причиной этому является отсутствие у штаммов синтеза ферментов и антифунгальных соединений необходимых для подавления роста грибов *Candida*. Штамм *Bacillus sp.* 3 проявил антагонистическую активность только к культуре *C. albicans* 1. Все исследуемые штаммы различались по уровню устойчивости к антибиотическим соединениям (табл. 2).

Таблица 2 Антибиотикорезистентность новых штаммов *Bacillus sp.*

Антибиотики	Диаметр зоны ингибирования роста, мм					
	<i>Bacillus sp</i> 1	<i>Bacillus sp</i> 2	<i>Bacillus sp</i> 3	<i>Bacillus sp</i> 4	<i>Bacillus sp</i> 5	<i>Bacillus sp</i> 6
Тетрациклин	15,7±0,6	14,7±0,6	25,3±0,6	23,0±1,7	16,7±0,6	24,7±1,2
Стрептомицин	11,3±0,6	10,7±0,6	15,7±1,2	15,3±1,5	16,0±2,0	15,3±1,2
Бензилпенициллин	0	0	19,7±2,1	0	13,5±3,5	0
Канамицин	18,0±2,0	17,7±0,6	19,0±1,0	20,3±0,6	23,0±1,0	18,0±1,0
Ампициллин	20,3±0,6	14,7±2,1	22,0±1,7	0	17,3±2,1	0
Доксицилин	22,3±0,6	21,7±0,6	23,0±1,7	22,7±1,2	22,7±0,6	26,0±1,0
Тилозин	22,0±1,7	18,7±0,6	22,3±1,2	23,3±2,3	20,7±0,6	20,3±1,5
Левомецетин	23,6±1,5	24,3±1,5	12,7±4,2	21,3±0,6	27,7±0,6	22,3±1,2
Неомицин	14,3±1,5	14,0±1,0	21,0±1,0	16,7±0,6	14,7±1,5	21,7±2,1
Энрофлоксацин	32,0±2,6	30,3±1,5	34,3±1,2	22,7±1,2	26,0±1,0	30,7±0,6

Только для штаммов 3 и 5 была характерна чувствительность к действию всех антибиотиков. Для штаммов 1 и 2 установлена устойчивость к бензилпенициллину. Штаммы 4 и 6 были резистентны к действию обоих антибиотиков пенициллинового ряда (бензилпенициллину и ампициллину), что указывает на наличие у данных штаммов пеницилиназной активности. Остальные штаммы бацилл не проявляли антибиотикоустойчивости. Кроме того, все штаммы, за исключением *Bacillus sp.* 4, обладают высокой чувствительностью к действию энрофлоксацина. По отношению к тетрациклинам высокочувствительными оказались штаммы *Bacillus sp.* 3 и 6.

Из шести новых штаммов *Bacillus sp.* по результатам исследования свойств антагонистической активности и антибиотикоустойчивости наиболее перспективным для применения в сельском хозяйстве показал себя штамм *Bacillus sp.* 1. Данный штамм обладал антагонизмом в отношении таких патогенов животных как *S. marcescens*, *E. coli*, *C. albicans* и *Staphylococcus sp.* Кроме того *Bacillus sp.* 1 проявлял чувствительность к большому числу антибиотиков, что имеет важное значение в связи с распространением резистентности среди бактерий. Совокупность этих свойств штамма позволяет рассматривать его как потенциальную основу микробного биопрепарата для животноводства.

Литература

- Ирkitова А.Н., Яценко Е.С. Оптимизация метода определения антагонистической активности пробиотических бактерий // ТППП АПК, 2017. – № 5 (19). – С. 113–117.
- Орлова Т.Н. и др.. Изучение антибиотикоустойчивости нового ризосферного штамма *Bacillus pumilus* B-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2020. – № 1 (183). – С. 111–115.
- Сверчкова Н.В. Пробиотические препараты на основе бактерий рода *Bacillus* для животноводства, птицеводства и промышленного рыбоводства Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты, 2020. Т. 12. С. 252–264.
- Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки, 2017. – Т. 159. – С. 85–107.
- Хайруллина Н.И. и др. Влияние биологически активных веществ при выращивании молодняка крупного рогатого скота // Эффективное животноводство, 2021. № 2 (168). – С. 58–60.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016. – № 6 (2). – P. 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.