

**ОТБОР ШТАММОВ *BACILLUS SPP.* ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА
ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА***Д.Е. Дудник, А.Н., Иркитова, А.В. Малкова, Е.Н. Каргашилова**ФГБОУ «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия*

Инфекционные заболевания животных являются одной из наиболее значимых проблем сельского хозяйства. Интенсификация животноводства и, как следствие, содержание животных большими группами приводит к созданию благоприятных условий для роста патогенной и условно-патогенной микрофлоры в помещениях, где содержатся животные. Бактериальные инфекции в таких условиях начинают приобретать хронический характер и приводят к значительным экономическим потерям для предприятий [1].

Причиной бактериальных инфекций в большинстве случаев является проникновение патогенной микрофлоры внутрь организма, что приводит к снижению жизненных функций животного. Профилактика бактериальных инфекций включает повышение неспецифической устойчивости поголовья и дезинфекцию помещений, которые могут проводиться с помощью биологических препаратов на основе микроорганизмов [2, 3].

Повышение сопротивляемости организма возможно с помощью применения пробиотических препаратов. Использование пробиотиков не только позволяет снизить количество инфекции, но и ускорить выздоровление и минимизировать последствия антибиотикотерапии [3]. Особенно эффективны данные препараты в отношении профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний, летальность которых может достигать до 50 % [1, 3].

Профилактическая дезинфекция является неотъемлемой частью санитарно-гигиенических мероприятий в сельском хозяйстве. Для её проведения в основном используются химические средства, которые быстро действуют, эффективны, но и, вместе с тем, высокоопасны для животных, птиц и рабочего персонала [4]. Биологические дезинфектанты на основе бактерий являются более экологичной альтернативой химическим средствам и позволяют снижать численность патогенной и условно-патогенной микрофлоры. Помимо этого, применение биологической дезинфекции положительно сказывается на сохранности молодняка и среднесуточном приросте [5].

Бактерии рода *Bacillus* активно используются как компонент биологических чистящих средств, что обусловлено множеством свойств, повышающих дезинфицирующую способность средств. Бациллы синтезируют противомикробные соединения и органические кислоты, благодаря чему способны к конкурентному вытеснению и замещению патогенов на обрабатываемых поверхностях. Кроме того, применение дезинфектантов на основе бактерий *Bacillus* вызывает у патогенной и условно-патогенной микрофлоры потерю генов устойчивости к антибиотикам [6].

Исходя из вышеизложенного необходима разработка биологических препаратов для профилактики бактериальных инфекции сельскохозяйственных животных и птиц. Для этого в свою очередь необходим поиск и отбор штаммов с высоким антагонистическим потенциалом в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

В качестве объектов исследования были использованы штаммы *Bacillus spp.* из коллекции ИЦ Промбиотех АлтГУ. Все штаммы были выделены из различных экологических ниш: ризосфера растений, естественные водоемы, животноводческие и птицеводческие помещения.

В качестве тест-культур использовали 7 штаммов грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella spp.*, *Salmonella enterica Pullorum*, *Citrobacter freundii*, *Providencia alcalifaciens*.

Для культивирования всех микроорганизмов использовали L-бульон следующего состава (г/л): 5 NaCl, 5 дрожжевой экстракт, 15 пептон. Определение антагонизма проводили на плотной L среде аналогичного состава с добавлением микробиологического агара 15 г./л.

Антагонистическую активность оценивали методом перпендикулярных штрихов [7]. Для этого штаммы *Bacillus spp* и тест-культур для исследования предварительно выращивали в шейкере-инкубаторе на L-бульоне в течение 24 часов при 37 °С и вращении 220 об/мин. На поверхность плотной L среды высевали в виде прямого штриха (основной штрих) исследуемый штамм бацилл

и культивировали в термостате в течение 24 часов при 37 °С. По истечении времени штаммы тест-культур подседали штрихами перпендикулярно основному штриху и культивировали 24 часа в аналогичных условиях. Результаты оценивали по размеру зоны задержки роста тест-культуры на границе контакта с исследуемым штаммом. Все значения представлены в виде среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

В результате проведенного исследования установлено что из 17 штаммов только 7 обладали антагонистической активностью в отношении тест-культуры энтеробактерий (табл. 1).

Таблица 1. Антагонистическая активность штаммов *Bacillus* spp. в отношении энтеробактерий

Исследуемый штамм	<i>E. coli</i> 1	<i>E. coli</i> 2	<i>S. marcescens</i>	<i>Shigella</i> spp	<i>enterica Pullorum</i>	<i>freundii</i>	<i>alcalifaciens</i>
	Зона подавления роста тест-культуры, мм						
<i>licheniformis</i> 5	-	-	-	-	-	-	-
<i>licheniformis</i> 6	12,5 \pm 3,5	4,7 \pm 0,6	-	2,7 \pm 1,2	-	-	8,5 \pm 0,7
<i>licheniformis</i> 7	3,3 \pm 0,6	2,3 \pm 0,6	3,3 \pm 0,6	2,3 \pm 0,6	5,3 \pm 0,2	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0
<i>licheniformis</i> 8	2,0 \pm 0,0	1,7 \pm 0,6	3,0 \pm 0,0	2,8 \pm 0,3	-	-	2,0 \pm 0,0
<i>licheniformis</i> 10	-	-	-	-	-	-	-
<i>pumilus</i> 4	-	-	-	-	-	-	-
<i>pumilus</i> 5	-	-	-	-	-	-	-
<i>pumilus</i> 6	-	-	-	-	-	-	-
<i>pumilus</i> 7	-	-	-	-	-	-	-
<i>pumilus</i> 16	-	-	-	-	-	-	-
<i>firmus</i> 1	-	-	-	-	-	-	-
<i>firmus</i> 2	-	-	-	-	-	-	-
<i>firmus</i> 3	3,3 \pm 0,6	-	-	-	-	2,0 \pm 0,0	2,7 \pm 0,6
<i>megaterium</i>	5,7 \pm 0,6	-	-	-	3,0 \pm 0,0	-	1,0 \pm 0,0
<i>mojavensis</i>	-	1,0 \pm 0,0	-	3,7 \pm 0,6	2,0 \pm 0,0	-	-
<i>toyonensis</i> 15	-	-	-	-	-	-	-
<i>subtilis</i> group 1	3,3 \pm 0,6	2,7 \pm 0,6	4,0 \pm 1,0	3,7 \pm 0,6	3,1 \pm 0,3	2,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0

Примечание: «-» – антагонизм отсутствует

Для двух штаммов (*B. licheniformis* 7 и *B. subtilis* group 1) была отмечена антагонистическая активность в отношении всех грамотрицательных тест-культур. Напротив, штаммы *B. licheniformis* 5, *B. licheniformis* 10, *B. pumilus* 4, *B. pumilus* 5, *B. pumilus* 6, *B. pumilus* 7, *B. pumilus* 16, *B. firmus* 1, *B. firmus* 2 и *B. toyonensis* 15 не влияли на рост энтеробактерий. Для остальных бацилл антагонизм определен только в отношении отдельных штаммов тест-культур.

Причина отсутствия антагонистической активности у 59 % штаммов *Bacillus* spp может быть связана с тем, что для большинства штаммов бацилл характерна продукция антимикробных соединений, ингибирующих рост только грамположительных микроорганизмов и грибов. Грамотрицательные микроорганизмы зачастую обладают устойчивостью к антимикробным пептидам бактерий рода *Bacillus* или способны их инактивировать. Однако у некоторых видов бацилл, в том числе у видов *B. licheniformis* и *B. subtilis*, обнаружены макролактин, липопептиды, бактериоцины и бактериоцинподобные пептиды активные также в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе и энтеробактерий (субтилозин А, сурфацин, бацилизин) [8].

Для отбора штаммов *Bacillus* spp с наибольшим антагонистическим потенциалом использовали бальную систему. Степень антагонизма определяли по размеру зоны задержки роста тест-культуры: высокая активность – 11–30 мм, средняя – 4–11 мм, слабая – до 4 мм. Высокую антагонистическую активность оценивали в 3 балла, среднюю – в 2 балла, низкую – в 1 балл (табл. 2).

По результатам бальной оценки максимальные значения зафиксированы для 3 штаммов – *B. licheniformis* 6, *B. licheniformis* 7 и *B. subtilis* group 1. Другие 4 штамма *Bacillus* spp показали более низкие значения по представленной бальной системе.

Таблица 2. Оценка антагонистической активности штаммов *Bacillus spp*

Тест-культура	Исследуемый штамм						
	<i>licheniformis 6</i>	<i>licheniformis 7</i>	<i>licheniformis 8</i>	<i>firmus 3</i>	<i>megaterium</i>	<i>mojavensis</i>	<i>subtilis group 1</i>
Степень антагонизма							
<i>E. coli 1</i>	Высокая	Низкая	Низкая	Низкая	Средняя	-	Низкая
<i>E. coli 2</i>	Средняя	Низкая	Низкая	-	-	Низкая	Низкая
<i>marcescens</i>	-	Низкая	Низкая	-	-	-	Средняя
<i>Shigella spp</i>	Низкая	Низкая	Низкая	-	-	Низкая	Низкая
<i>enterica Pullorum</i>	-	Средняя	-	-	Низкая	Низкая	Низкая
<i>freundii</i>	-	Низкая	-	Низкая	-	-	Низкая
<i>alcalifaciens</i>	Средняя	Низкая	Низкая	Низкая	Низкая	-	Низкая
Сумма баллов							
	8	8	5	3	4	3	8

Примечание: «←» – антагонизм отсутствует

Таким образом по результатам исследования наибольшая антагонистическая активность была зафиксирована у штаммов *B. licheniformis 6*, *B. licheniformis 7* и *B. subtilis group 1*. Данные штаммы показали свою эффективность в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных грамотрицательных бактерий. В связи с чем штаммы *B. licheniformis 6*, *B. licheniformis 7* и *B. subtilis group 1* перспективны для включения в состав биологического препарата для животноводства.

Литература

1. Сазонова Е.А., Гунько М.В. Распространенность штаммов *E.coli* у различных видов животных и птицы // Ветеринария и кормление, 2023. – № 3. – С. 70–72.
2. Пивнева В.В. Перспективы профилактики инфекционных заболеваний животных в современных условиях // Форум молодых ученых, 2019. – № 12. – С. 724–726.
3. Афанасьева Ю.Г., Корбмахер Е.Р., Колодина Е.В., Лиманский В.В., Пушкарев В.А., Функ И.А. Пробиотики – альтернатива кормовым антибиотикам // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2023. – № 2 (220). – С. 65–72.
4. Шилова Е.Н., Вялых И.В., Кадочников Д.М., Субботина О.Г. Эффективность применения новых дезинфицирующих средств в ветеринарии // Аграрный вестник Урала, 2013. – № 8 (114). – С. 7–12.
5. 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.
6. De Cesare A., Caselli E., Lucchi A., Sala C., Parisi A., Manfreda G., Mazzacane S. Impact of a probiotic-based cleaning product on the microbiological profile of broiler litters and chicken caeca microbiota // Poultry Science, 2019. – V. 98. – P. 3602–3610.
7. ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Общая фармакопейная статья. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. – Москва, 2018. – Т. 2. – 3262 с.
8. Abriouel H., Franz C.M., Ben Omar N., Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins // FEMS Microbiology Reviews, 2011. – V. 35. – P. 201–232.