

РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ НА ОСНОВЕ *BACILLUS TOYONENSIS* B-13249 И *B. PUMILUS* B-13250**И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова**

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

Введение

При промышленном разведении креветок, ракообразных и других представителей аквакультуры фермеры часто встречаются с различными инфекциями объектов производства и, как следствие, массовой смертностью водных животных. К болезнетворным микроорганизмам в водной среде относятся представители р. *Vibrio* [1], *Salmonella*, *Escherichia coli* [2] и многие др. Для предотвращения крупных потерь при выращивании промысловых объектов, долгие годы применялись антибиотики, что со временем приводило к развитию генов резистентности к ним у большинства микроорганизмов. Чтобы устойчивость бактерий к антибиотикам не привела к экологической катастрофе, стоит задача поиска более безопасных способов борьбы с патогенными организмами. В связи с этим производители аквакультуры все чаще используют пробиотики в качестве профилактики и комплексном лечении инфекционных заболеваний [3].

Цель работы – разработать пробиотик для аквакультуры на основе штаммов рода *Bacillus*.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования при разработке пробиотика использовали 2 штамма споровых бактерий из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ: *B. toyonensis* B-13249 выделенный из ризосферы р. *Helianthus*, *B. pumilus* B-13250 – из ризосферы р. *Cichorium*.

Для проведения промышленных испытаний пробиотика использовали цисты жаброногого рачка *A. franciscana* двух партий ООО «Арсал». Испытания по проценту выклева и выходу биомассы артемий проводились на базе лаборатории ООО «Арсал», г. Яровое (Алтайский край, РФ). Еще одним объектом для испытаний были пресноводные креветки Розенберга. Испытания проводили на частной ферме, расположенной в Республике Казахстан. Использовали потомство самки *M. rosenbergii*, разделенное на 2 группы: контрольную и опытную [4].

Для восстановления культур, контроля численности и чистоты использовали следующие среды и реактивы: физиологический раствор, L(Лурия) – среда, жидкий L-бульон, Эндо.

При глубинном культивировании микроорганизмов в ферментерах использовали среды: глюкозо-пептонно-дрожжевая (ГПД [1]), пшеничная (ПС [5]), меласно-кукурузная бедная (МК-БС, собственная разработка), меласно-кукурузная обогащенная (МК-ОС [6], защитная (криопротекторная) на основе желатина и сахарозы [7].

Антагонистическую активность штаммов оценивали методом отсроченного антагонизма перпендикулярных штрихов. В качестве антагонистов использовали исследуемые штаммы *B. toyonensis* и *B. pumilus*, в качестве тест-культур – патогенные и условно-патогенные штаммы из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Антибиотикорезистентность исследуемых штаммов определяли диско-диффузионным методом на твердой L-среде [8].

Условия культивирования в биореакторах. Технологию производства биологического препарата отработывали на производственной площадке ИЦ «Промбиотех» АлтГУ. Промышленное глубинное культивирование производили в ферментерах 15 и 250 л объемом (ООО «Сторге», Россия).

Методы инкубации цист рачков *A. franciscana*. Цисты инкубировали в конусах в течение 48 ч при соответствующих параметрах промышленного разведения артемий. Опыт состоял из 4 вариантов для каждой из партий цист (1 – контроль, 2, 3, 4 – опытные варианты) в 5-и повторностях. Инкубацию науплиусов проводили, используя различные дозы пробиотика (г): 0 (контроль), 0,05, 0,1, 0,2 соответственно, на 2 г сухих цист артемий.

Методика испытания на креветках *M. rosenbergii*. Потомство креветки одной самки *M. rosenbergii* разделили на 2 группы: контрольная (пробиотик не добавлялся) и опытная, в кормлении которой использовали артемию, инкубированную с добавлением пробиотика. Каждая группа состояла из 200 личинок, которых выращивали в одинаковых аквариумных системах по 600 литров каждая. Фиксирование линек креветок осуществляли визуально, чтобы не травмировать животных [4].

Результаты и обсуждения

Антагонистическая активность. В настоящем исследовании в качестве тест-культур использованы 10 микроорганизмов 3 и 4 групп патогенности: *Staphylococcus aureus*, *St. Epidermidis*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*. В результате *B. pumilus* проявил антагонизм к 6 из 10 тест-культур, а *B. toyonensis* – к 7 из 10.

Антибиотикорезистентность. Оба исследованных штамма оказались чувствительны к антибиотикам: цефалексин, олеандомицин, энрофлоксацин, бензилпенициллин, моноцин; и не чувствительны к оксациллину.

Разработка технологии производства пробиотика для аквакультуры. Подбор питательных сред. Для выращивания посевного материала проверили две среды: L-бульон и ГПД с добавлением глюкозы, микро- и макроэлементов. Отмечено, что штамм *B. pumilus* 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* на ГПД – $4,60(\pm 0,15) \times 10^8$; на L-среде – $5,91(\pm 0,25) \times 10^9$. Таким образом L-среда является наиболее благоприятной для выращивания посевного материала в колбах, так как на ней бактерии достигают более высокого титра.

Исследование параметров глубинного культивирования непосредственно в ферментационном аппарате проводили на трех средах: ПС, МК-ОС, МК-БС. Для штамма *B. pumilus* через 24 часа культивирования наилучшие показатели оптической плотности – $2,400 (\pm 0,085)$, 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* максимальные показатели также достигнуты на среде МК-ОС: OD_{490} 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.

Подбор дозы инокулята. Исходная доза посевного материала для обоих исследуемых штаммов составила 10 %. Такой дозы оказалось достаточно для достижения заданных технологических параметров: титр КОЕ/г сухого концентрата достигает значения $1,31(\pm 0,04) \times 10^{12}$ КОЕ/г у штамма *B. pumilus*, и $3,30(\pm 0,11) \times 10^{11}$ КОЕ/г у штамма *B. toyonensis*. При снижении дозы посевного материала до 5,5 % и даже до 1 % отмечено, что в обоих случаях происходит обильное накопление биомассы. Масса сухого концентрата во всех исследованных вариантах находится в пределах 150 г. Следовательно, экономически эффективнее использовать инокулят дозой в 1 % (Евдокимов, Иркитова, 2022).

Влияние температуры на накопление биомассы. Для определения оптимальной температуры культивирования штаммы *B. pumilus* и *B. toyonensis* выращивали при одинаковых условиях в шейкере-инкубаторе «Innova 44» при температурах – 15, 25, 30, 37, 42 °С, скорость перемешивания – 250 об/мин, время – 24 ч. Культивирование проводилось в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, с заполнением 200 мл культуральной жидкости. Максимальный титр штамм *B. pumilus* достигал при температуре 37 °С – $4,60 (\pm 0,20) \times 10^9$ КОЕ/мл при оптической плотности – $0,574 (\pm 0,017)$. Наименьшие показатели наблюдались при 15 °С и 42 °С культивирования (КОЕ/мл: $3,40 (\pm 0,11) \times 10^8$ при 15, $1,00 (\pm 0,03) \times 10^9$ при 42, соответственно; OP_{490} : $0,089 (\pm 0,004)$ также при 15, $0,311 (\pm 0,015)$ – 42). Штамм *B. toyonensis* наибольшую численность также при температуре 37 °С – $4,35(\pm 0,19) \times 10^9$ КОЕ/мл, при оптической плотности – $0,995 (\pm 0,012)$. Наименьшие показатели при 15 и 42 °С (КОЕ/мл: $1,05(\pm 0,04) \times 10^8$ при 15, $3,95(\pm 0,15) \times 10^7$ при 42, соответственно; OP_{490} : $0,513 (\pm 0,022)$ при 15, при 42 – $0,370 (\pm 0,013)$).

Влияние активной кислотности среды на накопление биомассы. Исследуемые заданные значения среды pH: 5,6, 6,2, 6,8, 7,4. На 24 ч роста значение активной кислотности стремится к нейтральному положению, и в вариантах 5,6, 6,2, 6,8 значение pH в обоих исследуемых штаммах переросло изначально заданный уровень. При установке же 7,4 лишь в некоторых повторностях у *B. toyonensis* значение, незначительно (на 0,01), превышало задаваемый параметр. В исследованиях *B. pumilus* значение в 7,4 не достигалось ни разу. Наибольшее количество живых клеток обнаружено при культивировании штаммов на среде с pH=6,8: *B. pumilus* – $3,65(\pm 0,18) \times 10^9$, *B. toyonensis* – $1,25(\pm 0,05) \times 10^9$. При этом, наименьшие значения у штамма *B. pumilus* – $2,15(\pm 0,10) \times 10^9$ наблюдались при pH среды 5,6, а у *B. toyonensis* – $5,40(\pm 0,13) \times 10^8$ при pH среды 7,4.

Определение времени культивирования. В данном эксперименте каждый исследуемый штамм культивировали в течение 72 часов. К 24 часам роста, количество бактерий набирало наибольшее количество $8,20(\pm 0,40) \times 10^{10}$ КОЕ/мл у штамма *B. pumilus* и $3,05(\pm 0,15) \times 10^{11}$ КОЕ/мл у штамма *B. toyonensis*. Экспоненциальная фаза была зафиксирована для обоих штаммов в период от 2 до 18–20 ч.

Начиная с 20–24 часов культивирования наступала стационарная фаза, что способствует окончанию цикла ферментации и началу последующих производственных этапов. Через 48 часов инкубации титр незначительно снижался, в пределах одного порядка: у штамма *B. pumilus* – $6,30(\pm 0,21) \times 10^{10}$ КОЕ/мл, у штамма *B. toyonensis* – $4,15(\pm 0,15) \times 10^{11}$ КОЕ/мл, и дальнейшая тенденция к снижению продолжилась и на 72 часа культивирования.

Концентрирование культуральной жидкости. Для разработки метода выделения бактериальных клеток использовали высокоскоростную проточную центрифугу GTGQ-1251. Экспериментальным путем установлено, что оптимальной скоростью потока для данных культур является – от 100 л/час до 130 л/час.

Сушка биомассы. Выявлено, что в камере сублиматора концентрат бацилл необходимо замораживать в течение 8 часов при температуре минус 35 °С, либо заморозка производится в морозильной камере не менее 12 часов при температуре минус 20–25 °С. После завершения сушки из лотков вынимали сухой концентрат массы микробов, которые в дальнейшем проверяли на количество КОЕ/г и отправлялись на этап стандартизации готового продукта.

Стандартизация препарата. Стандартизацию пробиотика проводили в смесителе СМУ-ПБ-200. При фиксировании времени смешивания, обнаружено что при перемешивании в течение 60 мин концентратов бактерий с наполнителем – мальтодекстрином, однородность продукта обеспечивалась на 98 % во всех случаях, поэтому это считается оптимальным временем.

Масштабирование технологии производства пробиотика обеспечило получение опытной партии биопрепарата для проведения промышленных испытаний. Титр бацилл в готовом препарате составил 1×10^{10} КОЕ/г.

Испытание препарата на рачках артемии. Пробиотик оказал положительный эффект на процент выклева цист и выход биомассы *A. franciscana*. Установлена рекомендуемая доза препарата – 0,1 г / на 2 г цист. Увеличение процента выклева при добавлении пробиотика 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 составлял 5,30 ($\pm 0,60$) г и 4,60 ($\pm 0,50$) г, соответственно. При добавлении пробиотика к данным партиям в концентрации 0,1 г выход биомассы составлял 7,40 ($\pm 0,69$) г и 6,80 ($\pm 0,43$) г соответственно.

Испытания на креветках Розенберга. Согласно полученным данным, в опытной группе наблюдался более ранний выход *M. rosenbergii* из личиночной стадии – на 18 день, в контрольной группе – на 28 день. Выживаемость в обеих группах существенно не различалась и была более 90 %.

Заключение

Оба исследованных штамма обладают высокой антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре: *B. pumilus* проявил антагонизм к 6 из 10 тест-культур, а *B. toyonensis* – к 7 из 10.

Оба исследованных штамма не чувствительны к оксациллину.

Разработана технология и оптимальные условия производства пробиотика: посевная среда – L-бульон, основная ферментационная – МК-ОС; доза посевного материала – 1 %; температура выращивания обоих штаммов – 37 °С; pH = 6,8; время культивирования каждого штамма 24 ч; режим центрифугирования – 100 л/ч – 130 л/ч при 15000 об./мин; время лиофильной сушки 40 ч; время заморозки в камере сублиматора 8 ч при температуре –35 °С, в морозильной камере – не менее 12 ч при температуре –20–25 °С; для стандартизации оптимально 60 мин перемешивания для 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 сохраняется на протяжении 12 месяцев.

Пробиотик оказал положительный эффект на процент выклева цист и выход биомассы *A. franciscana*. Рекомендуемая доза – 0,1 г биопрепарата на 2 г цист. Увеличение процента выклева при добавлении пробиотика в данной концентрации к партии Z29.04 составило 1,4 %, при добавлении биопрепарата к партии С9 – 10 %. При добавлении пробиотика к промышленным партиям (Z29.04 и С9) выход биомассы увеличился на 39,6 % и 47,8 %, соответственно.

Новый пробиотик способствует более раннему выходу из личиночной стадии *M. rosenbergii* по сравнению с контрольной группой (18 и 28 дней соответственно).

Литература

1. Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021; 11(3):393–402. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>.
2. Faridullah M., Roy V.C., Lithi U.J. Prevalence of Salmonella and Escherichia coli contamination in shrimp (*Penaeus monodon*) farms, depots and processing plants in different areas of Bangladesh // Asian Journal of Medical and Biological Research. – 2016. – V. 2. – №. 2. – P. 171–176.
3. Goh Jo. X.H., Tan L.T. – H., Law J.W. – F., Khaw K. – Ye., Zengin G., Chan K. – G., Letchumanan V., Lee L. – H., Goh B. – H. Probiotics: Comprehensive Exploration of the Growth Promotion Mechanisms in Shrimps // Progress in Microbes and Molecular Biology. – 2023. – V. 6. – №. 1. a0000324.
4. Malkova A, Evdokimov I, Shirmanov M, Irkitova A, Dementyev D. New bacilli-based probiotic for aquaculture: efficacy study on *Macrobrachium rosenbergii* // BIO Web of Conferences. – 2022. – V. 42. e01011.
5. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Ильинская О.Н. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида Бацизулин // Ученые записки казанского университета. Естественные науки. – 2010. – Т. 152. – №. 4. – С. 169–178.
6. Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Воинова Т.М., Карташов М.И., Овчинников А.И. Патент РФ, № 2675934, 2018. 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.
7. Грачева И.В., Осин А.В., Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №. 3. – С. 5–12.
8. Орлова Т.Н., Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В., Дудник Д.Е. изучение антибиотикочувствительности нового ризосферного штамма *Bacillus pumilus* B-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2020. – Т. 183. – №. 1. – С. 111–115.
9. Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н. Определение доли инокулята культур *Bacillus pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249 при глубинном культивировании в ферментационных установках. Актуальная биотехнология. 2022. № 1. С. 232–235.